

Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Enzymvarianten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Tobias Dietrich Haase
aus Berlin

1. Referent:	Professor Dr. Soenke Behrends
2. Referent:	Professor Dr. Uwe Panten
eingereicht am:	04.08.2010
mündliche Prüfung (Disputation) am:	21.10.2010

Druckjahr 2010

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

T. Haase, N. Haase, J.R. Kraehling, and S. Behrends. 2010. Fluorescent fusion proteins of soluble Guanylyl-Cyclase indicate proximity of the heme nitric oxide domain and catalytic domain.

PLoS One. 5(7):e11617. doi:10.1371/journal.pone.0011617

N. Haase, **T. Haase**, J.R. Kraehling, and S. Behrends. 2010. Direct fusion of subunits of heterodimeric nitric oxide sensitive Guanylyl-Cyclase leads to functional enzymes with preserved biochemical properties: evidence for isoform specific activation by ciguates. *Biochem Pharmacol.* (in Revision)

Tagungsbeiträge

T. Haase, N. Haase, and S. Behrends. 2009. Direct evidence for close proximity of catalytic and regulatory domains of heterodimeric sGC based on fluorescence resonance energy transfer. *BMC Pharmacology*. 9:P21.

T. Haase, N. Haase, M. Busker, J.R. Kraehling, M. Linnenbaum, S. Oberle, and S. Behrends. 2010. Generation of monomeric "conjoined" NO-sensitive Guanylyl-Cyclase enzyme complexes. *Jahrestagung der DPhG 2010*.

Meiner Familie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	11
1.1 Der NO/cGMP Signalweg.....	12
1.1.1 NO-Synthasen.....	12
1.1.2 NO-sensitive Guanylyl-Cyclasen.....	13
1.1.2.1 Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase.....	16
1.1.2.2 Aufbau der Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase.....	17
1.1.3 cGMP Effektorsysteme.....	20
1.2 Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase als pharmakologische Zielstruktur.....	21
2. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG.....	25
3. MATERIAL UND METHODEN.....	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Chemikalien und Substanzen.....	26
3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien.....	28
3.1.3 DNA und Vektoren.....	30
3.1.4 Enzyme und Reagenziensysteme.....	30
3.1.5 Antikörper.....	31
3.1.6 Zellen.....	31
3.1.6.1 Bakterienstämme.....	31
3.1.6.2 Eukaryotische Zelllinien.....	32
3.1.7 Oligonukleotide.....	32
3.1.8 Hilfsmittel und Geräte.....	33
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	35
3.2.1 Transformation von DNA in chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	35
3.2.2 Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> -Kulturen.....	35
3.2.3 Analyse der präparierten Plasmid DNA.....	36
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	36
3.2.5 Gerichtete Mutation einzelner Nukleotide.....	37

3.2.6 Konstruktion von Expressionsplasmiden.....	37
3.2.7 Herstellung des blau-fluoreszierenden Proteins Azurite durch gerichtete Mutation von GFP	41
3.3 Proteinbiochemische Methoden und Zellkultur.....	42
3.3.1 Proteinexpression im Sf9/Baculovirussystem.....	42
3.3.1.1 Kultivierung von Sf9-Zellen	43
3.3.1.2 Herstellung rekombinanter Baculoviren	43
3.3.1.3 Transposition der Konstrukte aus dem Transfervektor pFASTBAC in das Baculovirus-Genom.....	43
3.3.1.4 Transfektion der Sf9-Zellen.....	44
3.3.1.5 Amplifikation der rekombinanten Viren.....	44
3.3.1.6 Titerbestimmung der Viruslösungen.....	45
3.3.2 Infektion von Sf9-Zellen zur Herstellung von rekombinantem Protein	46
3.3.3 Kultivierung von HEK 293-Zellen	46
3.3.4 Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen.....	46
3.3.5 Gewinnung des rekombinanten Proteins.....	47
3.3.6 Quantitativer Proteinnachweis.....	47
3.3.7 Bestimmung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität	47
3.3.8 Western-Blot-Analyse.....	49
3.4 Anreinigung rekombinanter Proteine aus Sf9-Zellen mittels <i>Strep</i> -Tactin Chromatographie.....	50
3.4.1 Herstellung der cytosolischen Fraktion aus Sf9-Zellen	50
3.4.2 Affinitätschromatographie mittels <i>Strep</i> -Tactin.....	51
3.5 Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET).....	51
3.5.1 Sensitized emission FRET-Messung im Spektrofluorometer	54
3.5.2 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	56
3.6 Statistische Auswertung.....	56
4. ERGEBNISSE.....	57
4.1 Etablierung der FRET-Methode	57

4.2 Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Heterodimeren	61
4.2.1 Expression der fluoreszenzmarkierten Untereinheiten im Sf9/Baculovirus System	61
4.2.2 Messung der Enzymaktivität der fluoreszenzmarkierten Enzymvarianten.....	62
4.2.3 Untersuchung von Enzymvarianten mit aminoterminal markierter β_1 -Untereinheit	64
4.2.3 FRET-Untersuchung an fluoreszenzmarkierten Enzymvarianten.....	66
4.3 Fusion der Guanylyl-Cyclase Untereinheiten mittels eines fluoreszierenden Proteins	69
4.3.1 Expression der Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine im Sf9/Baculovirus System	70
4.3.2 Messung der Enzymaktivität der Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine	71
4.3.3 Anreinigung des β_1 YFP α_2 Guanylyl-Cyclase Fusionsproteins.....	72
4.3.4 FRET-Untersuchung an Guanylyl-Cyclase Fusionsproteinen	73
4.5 <i>In vivo</i> Untersuchung fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Enzymvarianten.....	77
4.5.1 Expression fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine in HEK 293-Zellen.....	78
4.5.2 Untersuchung der Lokalisation der fluoreszenzmarkierten α_2 -Enzymisoform.....	83
4.5.2 <i>In vivo</i> Untersuchung möglicher Interaktionspartner der Guanylyl-Cyclase α_2 -Isoform	85
5. DISKUSSION	89
5.1 Domänenorganisation in der heterodimeren NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase	89
5.2 Fusion der Guanylyl-Cyclase Untereinheiten	99
5.3 Isoformspezifische Lokalisation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase	100
6. ZUSAMMENFASSUNG	103

7. LITERATURVERZEICHNIS	104
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	118
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	120

1. Einleitung

Die Anpassung von Zellen an veränderte Umweltbedingungen gehört zu den grundlegendsten Prozessen innerhalb biologischer Systeme. Dabei spielt die Kommunikation zwischen den Zellen und die Informationsweiterleitung eines extrazellulären Signals in das Innere der Zelle eine zentrale Rolle. Zellen reagieren auf ihre Umgebung, indem externe Signale über Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder innerhalb der Zelle empfangen werden. Die Bindung dieser externen Signale an Rezeptoren veranlasst die Produktion von intrazellulären Botenstoffen (sekundäre Botenstoffe), was wiederum zu einer adaptiven Veränderung der Zellphysiologie führt. In den Prozessen der Informationsweiterleitung sind verschiedene sekundäre Botenstoffe miteinander verschaltet. Sie bilden Kaskaden, die das ursprüngliche Signal amplifizieren und zu einer zellulären Antwort führen. Zu den wichtigsten und am längsten bekannten sekundären Botenstoffen gehören die cyclischen Nukleotide, cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP).

Nach der Entdeckung von cAMP als erstes cyclisches Nukleotid mit physiologischer Bedeutung in den 50er Jahren [1-2] wurde in den 60er Jahren cGMP als zweites cyclisches Nukleotid entdeckt [3]. Seine potenzielle physiologische Bedeutung konnte durch den Nachweis von endogenem cGMP im Urin von Ratten gezeigt werden [4]. In nachfolgenden Untersuchungen konnte cGMP in fast allen Geweben von Säugetieren nachgewiesen werden [5-6]. Weitere Arbeiten zur cGMP Sekretion [7-8] machten deutlich, dass in Zellen ein regulierter cGMP Spiegel vorliegt, der durch cGMP produzierende Guanylyl-Cyclasen und cGMP Sekretionsmechanismen bzw. cGMP abbauende Phosphodiesterasen aufrecht erhalten wird. Von den cGMP bildenden Guanylyl-Cyclasen, deren Existenz 1969 von mehreren Gruppen gezeigt werden konnte [9-12], konnten eine lösliche- und eine membrangebundene Form isoliert werden [13-15]. Im Gegensatz zu den früher charakterisierten Adenylyl-Cyclasen, waren zu dieser Zeit keinerlei Modulatoren der Guanylyl-Cyclase-Aktivität bekannt. Auf der Suche nach Aktivatoren der Guanylyl-Cyclase konnte gezeigt werden, dass die Infusion von Ca^{2+} die cGMP Konzentration im Urin erhöht [16]. Des Weiteren wurde nach Zugabe von Acetylcholin oder Bradykinin bei der Perfusion von Rattenherzen ein erhöhter cGMP Spiegel beobachtet [17]. Später fanden mehrere

Forschergruppen heraus, dass das durch Glyceroltrinitrat freigesetzte Stickstoffmonoxid (NO) die lösliche Form der Guanylyl-Cyclase aktiviert [18-21]. Dieser Effekt wurde jedoch als nicht-physiologisches Phänomen interpretiert, da zu diesem Zeitpunkt NO ausschließlich als giftiges Gas ohne physiologische Bedeutung angesehen wurde. Etwa zur selben Zeit wurde die durch Acetylcholin induzierte Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur untersucht und auf den „*endothelial derived relaxing factor*“ (EDRF) zurückgeführt (Furchgott and Zawadzki 1980). Struktur und Wirkmechanismus des EDRF waren bis dahin unbekannt, doch es konnte gezeigt werden, dass die Relaxation der Gefäßmuskulatur über eine Erhöhung des intrazellulären cGMP Spiegels und eine gesteigerte Proteinphosphorylierung gesteuert wird [22-23]. Es wurde vermutet, dass es sich bei EDRF um einen endogenen Nitrovasodilator handelt [23]. Schließlich konnte von Ignarro und Palmer gezeigt werden, dass der EDRF das gasförmige Radikal Stickstoffmonoxid (NO) ist [24-25]. Durch die Entdeckung der NO-Synthase (NOS) als ein Enzym, welches aus der Aminosäure Arginin Stickstoffmonoxid bildet, wurde die letzte Komponente im NO/cGMP Signalweg identifiziert [26-29]. Die überraschende Entdeckung, dass NO als körpereigenes Signalmolekül im Herzkreislaufsystem fungiert, wurde 1998 durch die Vergabe des Nobelpreises für Medizin an Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad gewürdigt [30-32].

1.1 Der NO/cGMP Signalweg

1.1.1 NO-Synthasen

In Eukaryoten wird NO durch die NO-Synthasen (NOS) aus der Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin gebildet. Es gibt drei Isoformen der NO-Synthasen: die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS) und die induzierbare (iNOS) Form. Die endotheliale- und die neuronale NO-Synthase werden konstitutiv exprimiert, während die Expression der induzierbaren NO-Synthase durch immunstimulatorische Signale reguliert wird. Die konstitutiv exprimierten Isoformen der NO-Synthase (eNOS und nNOS) produzieren NO im unteren nanomolaren Bereich, dabei wird ihre Aktivität durch die Bindung von Ca^{2+} und Calmodulin reguliert (zur Übersicht siehe [33-35]). Die eNOS spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Gefäßtonus. Dabei wird die eNOS Ca^{2+} -vermittelt durch Acetylcholin, Histamin, Bradykinin oder Scherstress aktiviert. Das produzierte NO diffundiert in die glatte Muskulatur, wo es zur

Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur kommt. Das von der nNOS in Nervenzellen produzierte NO wirkt im zentralen- und peripheren Nervensystem unter anderem als Neurotransmitter und Neuromodulator. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird in den Zellen des Immunsystems, durch bakterielle Endotoxine oder inflammatorische Cytokine, hoch reguliert [36]. Unabhängig vom intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel produziert die iNOS große Mengen an NO die um das 1000-fache höher sein können als die Mengen, die durch konstitutive NOS Formen produziert werden [37]. Das von der iNOS freigesetzte NO wirkt über die Bildung von oxidativen Stress antibakteriell im Rahmen einer Immunantwort [27, 38-39]. Die Bedeutung von Stickstoffmonoxid in der Immunabwehr konnte in iNOS defizienten Mäusen gezeigt werden, die nicht mehr, oder nur in geringem Ausmaß, in der Lage waren, parasitären und bakteriellen Infektionen standzuhalten [40-41].

NO besitzt ein ungepaartes Elektron, ist elektrisch neutral und kann daher leicht durch cytosolische und membranäre Kompartimente diffundieren. Das freie Radikal NO reagiert in wässriger Lösung schnell zu Nitrit und Nitrat. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass NO in biologischen Systemen eine ungewöhnlich lange Halbwertszeit hat [42]. Dadurch ist es möglich, dass NO etwa 200 μm von seinem Bildungsort aus diffundieren kann [43], um als extrazellulärer Botenstoff zu fungieren [44]. Auf diese Weise kann endothelial gebildetes NO in die glatte Gefäßmuskulatur diffundieren und dort durch Bindung an die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase zur Vasorelaxation führen, aber auch in das Gefäßlumen gelangen um dort Effekte, wie eine Hemmung der Thrombozytenaggregation, auszulösen.

1.1.2 NO-sensitive Guanylyl-Cyclasen

Der Hauptrezeptor für NO als Signalmolekül ist die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase. Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase ist ein heterodimerer Enzymkomplex, an dessen prosthetischer Hämgruppe NO bindet und zu einer Stimulierung der Enzymaktivität führt. Sie katalysiert die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) zum sekundären Botenstoff cGMP (Abbildung 1). Die Stimulierung durch NO führt zu einer um das 200-400-fache gesteigerten Enzymaktivität (zur Übersicht siehe [45-47]). Die NO-sensitiven Guanylyl-Cyclasen sind in vielen Eukaryoten von der Fruchtfliege bis zum Menschen beschrieben und werden in Säugetieren ubiquitär

exprimiert. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten, α und β , wobei vier verschiedene Subtypen charakterisiert sind. Die α_1 -Untereinheit des Rinderlungenenzym besitzt ein Molekulargewicht von 73 kDa [48], während die β_1 -Untereinheit ein Molekulargewicht von 70 kDa aufweist [49]. Das Molekulargewicht der entsprechenden Untereinheit aus der Ratte beträgt 70 kDa und 82 kDa. Weitere Untereinheiten wurden im menschlichen fötalen Gehirn (82 kDa) [50] und in der Niere (76 kDa) [51] entdeckt und als α_2 und β_2 bezeichnet. Aus den Guanylyl-Cyclase Untereinheiten werden im Menschen zwei heterodimere Isoformen gebildet: α_1/β_1 und α_2/β_1 . Die Dimerisierung beider Untereinheiten ist die Voraussetzung für die Bildung eines aktiven Enzymkomplexes. Die rekombinante Expression eines aktiven Enzyms ist bisher nur durch Koexpression beider Untereinheiten möglich. Die beiden Enzymisoformen zeigen im angereinigtem Zustand keine enzymkinetischen Unterschiede. Jedoch konnte für das α_2/β_1 Isoenzym eine Splicevariante der α_2 - (α_{2i}) Untereinheit charakterisiert werden, die zusammen mit der β_1 -Untereinheit einen inaktiven Enzymkomplex bildet. Die inaktive α_2 Form enthält eine Insertion von 31 Aminosäuren innerhalb der katalytischen Domäne und scheint als dominant negatives Enzym aufzutreten [52]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die α_2/β_1 Isoform über die carboxyterminale Aminosäuresequenz RETSL der α_2 Untereinheit, an die PDZ Domänen des Gerüstproteins PSD 95 (*post synaptic density protein* 95 kDa) bindet [53]. Deshalb wird vermutet, dass sich die Isoformen der Guanylyl-Cyclase in der zellulären Lokalisation unterscheiden. Untersuchungen zur Expression der α_2 -Untereinheit zeigten, dass diese weniger ubiquitär exprimiert ist als die α_1/β_1 Isoform, wobei eine besonders hohe Expression im Gehirn und in der Plazenta festgestellt wurde [54-56]. Die β_2 -Untereinheit, deren mRNA in Ratten hauptsächlich in der Niere vorkommt [51], bildet ein aktives Homodimer. Enzymaktivität konnte jedoch nur in Anwesenheit von Mn^{2+} als Kofaktor gemessen werden. Daher ist die physiologische Bedeutung der β_2 -Untereinheit noch unklar [57-58].

Die vielseitigen physiologischen Bedeutungen der Isoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase konnten an Knockout Modellen untersucht werden [59-62]. Ein kompletter Verlust der Guanylyl-Cyclase durch einen Knockout der β_1 -Untereinheit führt zu einer drastisch reduzierten Lebenserwartung der β_1 defizienten Mäuse, wobei 80 % der homozygoten Guanylyl-Cyclase defizienten Tiere innerhalb der

ersten zwei Tage nach der Geburt sterben. Die Tiere zeigen einen erhöhten Blutdruck und eine verminderte Herzfrequenz. Verantwortlich für die hohe Mortalitätsrate ist eine verminderte gastrointestinale Motilität [60]. Der Phänotyp ähnelt dem von Proteinkinase G I defizienten Tieren, die auch eine reduzierte Lebenserwartung zeigen und an gastrointestinalen Komplikationen versterben [63-64]. Insgesamt zeigen die Studien an den Guanylyl-Cyclase defizienten Mäusen die Bedeutung des NO/cGMP Signalweges im gastrointestinalen Trakt. Das Fehlen einer einzelnen Isoform der Guanylyl-Cyclase durch Knockout der jeweiligen α -Untereinheit hat weniger drastische Auswirkungen: Homozygote α_1 - oder α_2 -Knockout Mäuse werden in einem normalen Mendelschen Verhältnis geboren und haben keine verminderte Lebenserwartung. Guanylyl-Cyclase α_1 defiziente Tiere zeigen nur einen leicht erhöhten Blutdruck [65], wobei geschlechtsspezifische Unterschiede auftreten [59]. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine Isoform das Fehlen der Zweiten zumindest teilweise ausgleichen kann. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die α_1/β_1 Isoform der Guanylyl-Cyclase verantwortlich für die NO-vermittelte Regulation der Thrombozytenaggregation und für die pulmonale Vasorelaxation ist [62, 65].

1.1.2.1 Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase

Innerhalb der aminoterminalen Domäne der β_1 -Untereinheit befindet sich die prosthetische Hämgruppe der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, wobei das Histidin 105 der β_1 -Untereinheit als axialer Hämligand identifiziert wurde (Abbildung 2) [66-68]. Der durch die Bindung von NO an die prosthetische Hämgruppe ausgelöste Aktivierungsmechanismus ist noch nicht vollständig verstanden. Die prosthetische Hämgruppe der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase besteht aus einem fünffach koordiniertem Häm mit einem zweiwertigen zentralen Eisenatom und einem Histidin als axialen Liganden in der fünften Koordinationsbindung [66-69]. In der Guanylyl-Cyclase zeigt das Häm ein Absorptionsmaximum bei 431 nm (Soret-Bande) im UV/Vis-Spektrum [70]. Nach Bindung von NO an die distale Seite des Häms kommt es zum Bruch der Bindung zum proximalen Histidin und zur Bildung eines fünffach-koordinierten Nitrosyl-Häm-Komplexes. Durch den Bruch der Bindung zum Histidin kommt es zur Aktivierung des Enzyms und zu einer Verschiebung der Soret-Bande auf 398 nm [71-74]. Neben NO bindet auch Kohlenmonoxid (CO) an die prosthetische Hämgruppe der Guanylyl-Cyclase, wobei die Bindung von CO zu einem sechsfach-koordinierten Häm-Komplex führt, ohne dass es zum Bruch der Bindung zum proximalen Histidin kommt. Dadurch kommt es nur zu einer zwei- bis vierfachen Stimulation der Enzymaktivität. Da im Körper CO beim Abbau von Häm durch Hämoxygenasen entsteht, wird die physiologische Bedeutung von CO als ein weiteres gasförmiges Signalmolekül diskutiert [75].

Untersuchungen zur NO-Bindung und Stimulation des Enzyms zeigten, dass es einen schwach und einen stark stimulierten Zustand des Enzyms gibt, wobei in beiden Zuständen ein fünffach koordiniertes Eisenatom vorliegt. Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass es eine zweite NO-Bindungsstelle geben muss. Nach den Ergebnissen von Derbyshire und Marletta ist diese zweite NO-Bindungsstelle unabhängig von der prosthetischen Hämgruppe. Möglicherweise handelt es sich dabei um ein Cystein, welches nitrosyliert wird [76]. Eine andere Vermutung ist, dass nach dem Bruch der Bindung zum Histidin ein weiteres NO Molekül an die proximale Seite des Häms bindet und es so übergangsweise zur Bildung eines Dinitrosyl-Komplexes kommt. Nach Auflösung dieses Übergangszustandes bleibt das proximal gebundene NO erhalten und stellt den

aktiveren Zustand des Enzyms dar [77]. Zusätzlich zur Stimulation durch NO, wird die Enzymaktivität der Guanylyl-Cyclase allosterisch durch GTP und ATP sowie durch die Produkte der enzymatischen Umsetzung, cGMP und Pyrophosphat reguliert [77-79]. Neben der Bindung an die prosthetische Hämgruppe der Guanylyl-Cyclase reagiert NO mit Sauerstoff über die Bildung von Distickstofftrioxid (N_2O_3) zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) und mit reaktiven Sauerstoffspezies wie Superoxid (O_2^-) zu Peroxynitrit (ONOO^-). Die Oxidationsprodukte des NO sind wiederum in der Lage, Thiole zu nitrosylieren und dadurch NO bereitstellende Speicher zu bilden oder die Struktur und Funktion von Proteinen zu verändern. Untersuchungen zeigten, dass geringe NO Konzentrationen zur Nitrosylierung der Guanylyl-Cyclase selbst führen und dadurch eine verminderte Stimulierbarkeit des Enzyms hervorrufen [80].

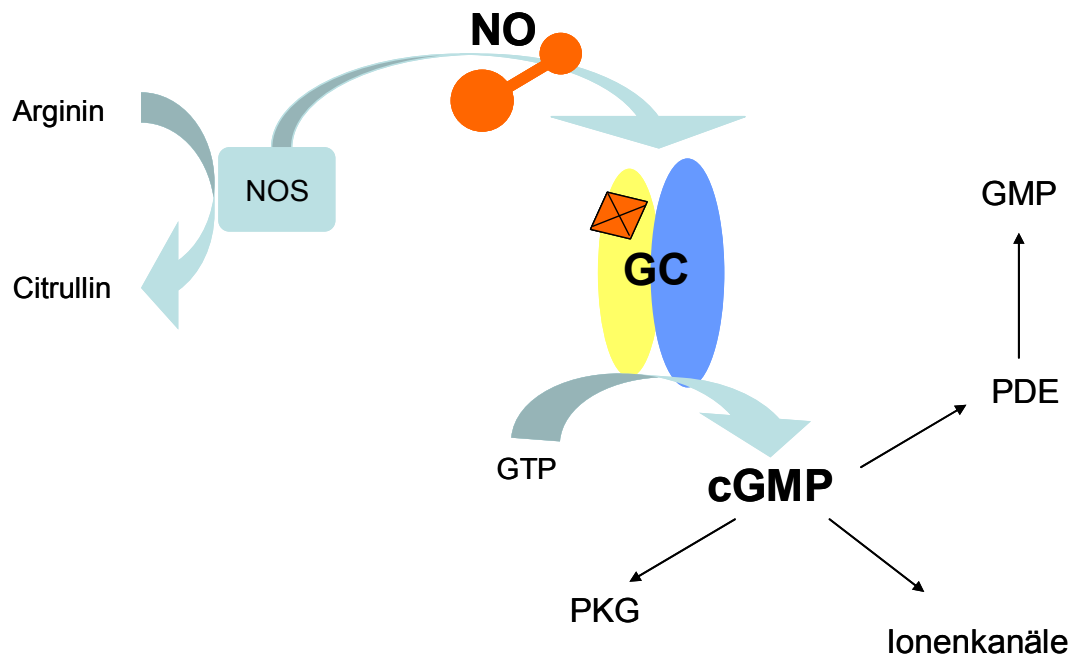


Abbildung 1: Der NO/cGMP Signalweg

NO wird von NO-Synthasen (NOS) gebildet und bindet an die prosthetische Hämgruppe der β_1 -Untereinheit der heterodimeren Guanylyl-Cyclase (GC). Dadurch wird die Umwandlung von GTP zu cGMP stimuliert. cGMP als second messenger reguliert die Aktivität der Proteinkinase G (PKG), cGMP abhängiger Ionenkanäle und cyclisch Nukleotid abhängiger Phosphodiesterasen (PDE), die cGMP zu GMP abbauen.

1.1.2.2 Aufbau der Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase

Die Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase werden jeweils in vier Domänen unterteilt, eine aminoterminal Hämbindungsdomäne (*heme nitric oxide/oxygen binding domain*, H-NOX), eine H-NOX assoziierte Domäne (H-NOXA),

einer coiled-coil Region (CC) und der carboxyterminalen katalytischen Domäne (siehe Abbildung 2) (zur Übersicht siehe [78]). Obwohl die α - und β_1 -Untereinheiten eine aminoterminal H-NOX Domäne aufweisen, ist nur die β_1 -Untereinheit an der Hämbindung beteiligt. Eine Deletion der H-NOX Domäne der α -Untereinheit hat keinen Einfluss auf die Ausbildung eines aktiven, NO-stimulierbaren Enzymkomplexes [81-83]. Eine Vielzahl der bisher charakterisierten H-NOX Proteine besitzt eine prothetische Hämgruppe wie bei der β_1 Untereinheit, wobei einige zusätzlich zu NO und CO auch Sauerstoff binden können. H-NOX Domänen findet man unter anderem in fakultativ aeroben sowie in obligat anaeroben Organismen, wo sie vermutlich als Sauerstoffsensoren dienen. Über die Strukturanalyse der H-NOX Domänen aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* und *Nostoc punctiforme* konnte man neue Erkenntnisse über die Funktionsweise der H-NOX der Guanylyl-Cyclase gewinnen [84-86]. So konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure Tyrosin 140 der β_1 H-NOX Domäne für die bevorzugte Bindung von NO und CO gegenüber Sauerstoff an die prothetische Hämgruppe verantwortlich ist. Durch den Vergleich der Kristallstrukturen aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* und *Nostoc punctiforme* in denen verschiedene Liganden gebunden waren (Fe-NO, Fe-CO, Fe²⁺), wurde über mögliche Aktivierungsmechanismen des Enzyms spekuliert. Aufgrund dieser Untersuchungen wird vermutet, dass der Bruch der Bindung zum Histidin zu einer Biegung der Hämgruppe und damit einer Konformationsänderung der H-NOX Domäne führt [87]. Wie diese Konformationsänderung an die katalytische Domäne weitergeleitet wird, ist bisher noch nicht bekannt. Das Signal könnte ähnlich wie für die membranständige Guanylyl-Cyclase vermutet, von den H-NOX Domänen, die der ANP-bindenden Region der membranständigen Guanylyl-Cyclase entsprechen würde, über die zentralen Domänen der Untereinheiten zu der katalytischen Domäne geleitet werden [88]. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die H-NOX Domänen der Guanylyl-Cyclase direkten Kontakt zur katalytischen Domäne haben. Es konnte gezeigt werden, dass koexprimierte isolierte, katalytischen Domänen basale Enzymaktivität aufweisen, die durch die Anwesenheit von isolierten H-NOX Domänen negativ beeinflusst werden [89]. Aufgrund dieser Untersuchungen vermuteten Winger und Marletta, dass die H-NOX Domäne durch direkte Interaktion mit den katalytischen Domänen, die Enzymaktivität inhibiert und NO über eine Auflösung dieser Inhibition aktivierend wirkt.

Die H-NOX assoziierte Domäne (H-NOXA) bildet in der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase eine Per/Arnt/Sim (PAS) Tertiärstruktur aus [87] und wird deshalb im Folgenden als PAS Domäne bezeichnet. Es ist bekannt, dass PAS Domänen für die Signalweiterleitung, Bindung von kleinen Liganden und für die Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen verantwortlich sind. Zusammen mit der *coiled coil* Region (CC) bilden sie die zentrale Region der Guanylyl-Cyclase Untereinheiten, die für die Dimerisierung der Enzymuntereinheiten verantwortlich ist. Mutationsscreenings zeigten, dass Veränderungen der Aminosäuresequenz der zentralen Region die Dimerisierung der Untereinheiten beeinträchtigten [87, 90-92]. Mithilfe der Kristallstruktur der PAS Domäne eines Histidinkinase gekoppelten Rezeptors aus *Nostoc punctiforme*, die eine hohe Homologie mit der H-NOXA Domäne der Guanylyl-Cyclase aufweist, konnte gezeigt werden, dass die Mutation der Aminosäuren Glutamin 368 der α_1 -Untereinheit und Glutamin 309 der β_1 -Untereinheit zu einem vollständigen Verlust der Dimerisierung der Guanylyl-Cyclase Untereinheiten führt [87].

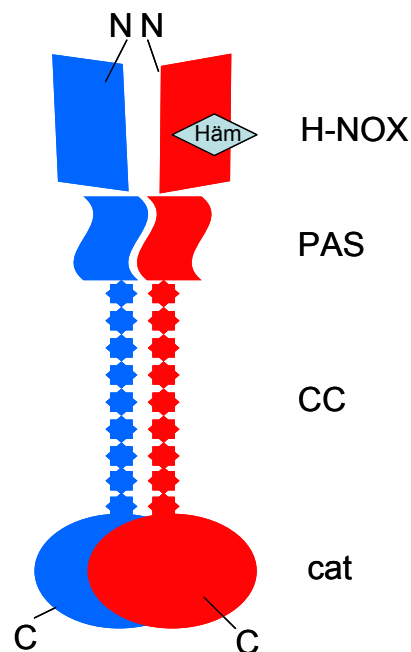


Abbildung 2: Aufbau der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten

Das heterodimere Enzym besteht aus einer β_1 - (rot) und einer α -Untereinheit (blau). Die Untereinheiten sind homolog aufgebaut. Aminoterminal befinden sich die H-NOX Domänen (H-NOX), gefolgt von den PAS-ähnlichen Domänen (PAS), der *coiled coil* Region (CC) und der carboxyterminalen katalytischen Domäne (cat). In der H-NOX Domäne der β_1 -Untereinheit befindet sich die prosthetische Hämgruppe (Häm). (Details siehe Text)

Am Carboxyterminus der Untereinheiten befinden sich die katalytischen Domänen, sie erstrecken sich von den Aminosäuren 467-690 und 414-619 der α_1 - bzw. β_1 -Untereinheit. Die katalytischen Domänen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, der membranständigen GC und der Adenylyl-Cyclase weisen eine hohe Homologie auf. Durch Sequenzvergleiche und Homologiemodelle konnten so die Aminosäuren, die an der Umsetzung des Substrats beteiligt sind, identifiziert werden. Erst vor kurzem wurde die Kristallstruktur der katalytischen Domäne einer Guanylyl-Cyclase aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* bestimmt. Die katalytischen Domänen wurden als ein Homodimer kristallisiert und weisen 40-50 % Homologie mit der membranständigen und der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase aus Säugetieren auf [93].

1.1.3 cGMP Effektorsysteme

Cyclisches GMP ist wie cAMP ein zellulärer Botenstoff, der für die Weiterleitung von Signalen innerhalb der Zelle verantwortlich ist. Über die Bindung an Effektorproteine reguliert cGMP eine Vielzahl wichtiger physiologischer Prozesse wie z.B. die Vasorelaxation, Thrombozytenaggregation und die Neurotransmission (siehe Abbildung 1) [94-95]. Dabei entfaltet cGMP einen Großteil seiner Wirkung durch die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen (PKG) [96]. Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen sind Serin/Threonin-Kinasen, die nach Aktivierung verschiedene physiologische Substrate phosphorylieren [97]. Zwei Enzymisoformen der PKG sind beschrieben, PKG I [98] und PKG II [99]. Während die PKG I als lösliches Enzym vorliegt, ist die PKG II über eine N-Myristoylierung in der Plasmamembran verankert [100-101]. Die PKG II konnte unter anderem in der Nebenniere und der Schleimhaut des gastrointestinalen Traktes lokalisiert werden, wo sie eine Rolle bei der Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bzw. beim transepithelialen Natrium/Chlorid-Transport im Darm spielt [102-104]. Die PKG I ist in hohen Konzentrationen in glatten Muskelzellen und Thrombozyten exprimiert und ist hauptverantwortlich für die vasodilatatorische und thrombozytenaggregationshemmende Wirkung von cGMP [64, 103, 105]. Die Kontraktion glatter Muskelzellen wird durch den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel reguliert. Verschiedene Mechanismen, die über die Aktivierung der PKG zu einem Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und damit zur Relaxation glatter Muskelzellen führen, sind

beschrieben. So erhöht die PKG I vermittelte Phosphorylierung der Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle (BKCa) deren „Offenwahrscheinlichkeit“ und bewirkt eine Hyperpolarisation der Membran. Dadurch werden Ca^{2+} -Kanäle geschlossen und der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle vermindert, wodurch die Ca^{2+} -Konzentration sinkt [106-107]. Des Weiteren phosphoryliert die PKG I das IP3-Rezeptor assoziierte cGMP-Kinase Substrat (IRAG) und liegt dann mit IRAG und dem IP3-Rezeptor Typ I in einem trimeren Komplex an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums vor. Durch die Phosphorylierung von IRAG wird der Ca^{2+} -Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum gehemmt, wodurch wiederum die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration sinkt [108-110]. Weitere Zielproteine für cGMP sind cyclisch Nukleotid-gesteuerte Kationenkanäle [111]. Die Bindung cyclischer Nukleotide moduliert das Öffnungsverhalten dieser Kationenkanäle und hat so Einfluss auf das Membranpotenzial und die Ionenkonzentration in der Zelle [112-113]. Cyclisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle spielen eine zentrale Rolle bei der Erzeugung elektrischer Signale in Spermien und Sinneszellen [114-115]. Darüber hinaus sind sie an der Ausbildung rhythmischer Aktivität im Herzen und im Gehirn beteiligt [116-117]. Deshalb werden sie auch als Schrittmacherkanäle bezeichnet. Die Dauer und Lokalisation der cGMP vermittelten Signalübertragung wird durch Phosphodiesterasen reguliert, die den Botenstoff cGMP zu GMP abbauen. Dabei hydrolysieren die Isoformen 5, 6, 9 spezifisch cGMP, während die Isoformen 1, 2, 3, 10 und 11 cGMP und cAMP abbauen. Da dabei die cyclischen Nukleotide nicht nur als Substrat dienen, sondern auch allosterisch die Aktivität der Phosphodiesterasen regulieren, ist es möglich, dass cGMP die cAMP abhängige Signaltransduktion beeinflusst und umgekehrt [118]. Aktuelle pharmakologische Relevanz erlangte die Phosphodiesterase 5, die durch spezifische Hemmstoffe wie Sildenafil blockiert wird und damit zur Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in glatten Gefäßmuskelzellen führt. Phosphodiesterase 5 Inhibitoren werden zur Behandlung der erektilen Dysfunktion und der pulmonalen Hypertonie eingesetzt.

1.2 Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase als pharmakologische Zielstruktur

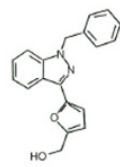
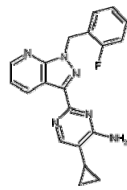
NO-freisetzende Verbindungen werden seit über 100 Jahren zur Behandlung der stabilen Angina-Pectoris-Symptomatik, des akuten Koronarsyndroms und bei der akuten und chronischen Herzinsuffizienz eingesetzt [119]. Organische Nitrate wie

das Glyceroltrinitrat wirken als endothelunabhängige Nitrovasodilatoren. Die vasodilatatorische Wirkung betrifft in erster Linie Venen, große Koronararterien, die Aorta und Kollateralen. Die durch organische Nitate herbeigeführte venöse Vasodilatation bewirkt am Herzen eine Vorlastsenkung und damit eine verringerte Wandspannung. Dies führt neben einer Steigerung der Koronarperfusion auch zu einer Senkung des myokardialen Sauerstoffbedarfs [120-122]. Die Freisetzung von NO aus organischen Nitraten beschäftigt Forscher seit vielen Jahren und ist bis heute noch nicht im Detail verstanden. Es wird vermutet, dass die Reduzierung von NO aus der Nitratgruppe *in vivo* durch spezifische Enzyme katalysiert wird [123-124]. Ein aussichtsreicher Kandidat, der in der Bioaktivierung von organischen Nitraten eine Schlüsselrolle spielen könnte, ist die mitochondriale Aldehyddehydrogenase (mtALDH, ALDH-2) [125]. Trotz nachweislich guter Wirkung organischer Nitate bei der Akutgabe ist die Langzeittherapie durch eine Toleranzentwicklung sowie durch die Induktion einer endothelialen Dysfunktion limitiert [126]. Beide Phänomene sind möglicherweise auf eine vermehrte Bildung freier Radikale und die Nitrosylierung von Thiolen verschiedenster Proteine in der Zelle zurückzuführen [127].

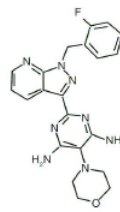
1994 entdeckte man, dass das Benzylindazol Derivat 3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl-indazol (YC-1) durch direkte Aktivierung der Guanylyl-Cyclase ein potenter Inhibitor der Thrombozytenaggregation ist (Abbildung 3) [128-129]. Es konnte gezeigt werden, dass die YC-1 vermittelte Aktivierung der Guanylyl-Cyclase unabhängig von NO ist, jedoch die Anwesenheit der prosthetischen Hämgruppe erfordert. YC-1 führt zu einer zehnfachen Aktivierung der Guanylyl-Cyclase in Abwesenheit von NO [130-131]. Darüber hinaus bewirkt die Bindung von YC-1 an die Guanylyl-Cyclase eine signifikante Steigerung der Sensitivität gegenüber NO und eine Steigerung der maximalen katalytischen Aktivität in Anwesenheit von NO. Des Weiteren wird in Anwesenheit von YC-1 die ansonsten schwache Stimulation durch CO um das hundertfache verstärkt [131-134]. Bei Untersuchungen von Friebe und Koesling zeigte sich bei der YC-1 vermittelten Stimulierung des Enzyms keine Veränderung der Soret Bande. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass die Aktivierung und Sensitivierung des Enzyms nicht über eine direkte Interaktion mit der Hämgruppe erfolgt [135]. Diese Ergebnisse zusammen mit später durchgeführten Mutationsscreenings deuteten auf eine direkte Interaktion von YC-1 mit den katalytischen Domänen hin [136-138]. Spätere Studien zu diesem Thema zeigten

dagegen eine Veränderung der spektroskopischen Eigenschaften des Enzyms in Anwesenheit von YC-1 auch nach Deletion der katalytischen Domäne der β_1 -Untereinheit [133]. Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse ist der genaue Mechanismus der YC-1 Stimulierung noch nicht abschließend geklärt. Auf der Basis von YC-1 als Leitstruktur wurden weitere NO-unabhängige Guanylyl-Cyclase-Modulatoren entwickelt. Zu diesen Substanzen gehört BAY 41-2272, BAY 41-8543 und BAY 63-2521 (siehe Abbildung 3). Diese hämabhängigen Guanylyl-Cyclase-Modulatoren stimulieren, ähnlich wie YC-1, das Enzym in Anwesenheit von NO und weisen vasodilatatorische und thrombozytenaggregationshemmende Effekte auf [139-142]. Dabei ist die vasodilatatorische Potenz von BAY 41-2272 etwa zwei- bis dreifach höher als die von YC-1. Im Gegensatz zu YC-1 weist BAY 41-2272 keine relevante Phosphodiesterase Hemmung auf [139]. In Abwesenheit von NO stimuliert BAY 41-2272 die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität etwa um das 20-fache [140]. Die Anwendbarkeit des Guanylyl-Cyclase Stimulators BAY 63-2521 (Riociguat) als Wirkstoff zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie wird zurzeit in klinischen Studien geprüft [143].

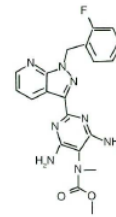
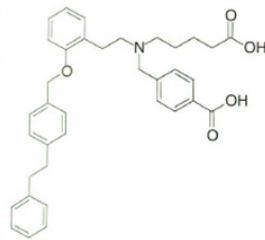
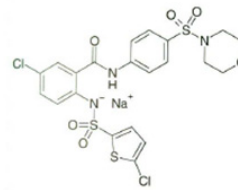
Neben diesen hämabhängigen Guanylyl-Cyclase-Stimulatoren wurden auch hämunabhängige Aktivatoren entdeckt. BAY 58-2667 (Cinaciguat) und HMR1766 (Ataciguat) aktivieren spezifisch den hämfreien Enzymkomplex (siehe Abbildung 3) [144-145]. Die Behandlung des Enzyms mit Detergenzien oder die Oxidation des zentralen Eisenions des Häms, führen zu einem Verlust der Hämgruppe [73, 146]. Diese hämfreien Enzymkomplexe werden durch Cinaciguat und Ataciguat aktiviert (zur Übersicht siehe [145, 147]). Untersuchungen zeigten, dass durch oxidativen Stress und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies auch *in vivo* hämdefiziente Guanylyl-Cyclase Enzymkomplexe vorkommen [141]. Diese inaktiven Enzyme sind das Ziel des hämunabhängigen Guanylyl-Cyclase Aktivators Cinaciguat, der diese nicht nur aktiviert, sondern auch stabilisiert und damit vor Proteasom-vermittelterm Abbau schützt [148]. Die neuartige Wirkstoffklasse der Guanylyl-Cyclase-Modulatoren wird seit 2008 von der WHO mit der Endung *-ciguat* gekennzeichnet.

hämabhängigYC-1
(Lifciguat)

BAY 41-2272



BAY 41-8543

BAY 63-2521
(Riociguat)**hämunabhängig**BAY 58-2667
(Cinaciguat)HMR 1766
(Ataciguat)**Abbildung 3: Hämabhängige und hämunabhängige Modulatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase**

YC-1 (3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl-indazol), BAY 41-2272 (5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine), BAY 41-8543 (2-[1-[(2-fluorophenyl)methyl]-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-5-(4-morpholinyl)-4,6-pyrimidinediamine) und BAY 63-2521 (Methyl-N-[4,6-Diamino-2-[1-[(2-fluorophenyl)methyl]-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-5-pyrimidinyl]-N-methyl-carbaminat) sind hämabhängige Stimulatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase. BAY 58-2667 (Cinaciguat; 4-[[[(5-hydroxy-5-oxopentyl)-2-[2-[(4-phenethylphenyl)methoxy]phenyl]ethyl]amino]-methyl]benzoic acid) und HMR 1766 (Ataciguat, 5-Chloro-2-((5-chloro-2-thienyl)sulfonylamino)-N-(4-(morpholin-4-ylsulfonyl)phenyl)benzamide) sind hämunabhängige Aktivatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase.

2. Zielsetzung und Fragestellung

1. Die Domänenorganisation sowie der Aktivierungsmechanismus innerhalb der heterodimeren NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase sind weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es möglich ist, mittels fluoreszenzmarkierter Untereinheiten und der FRET-Methode die Domänenorganisation sowie mögliche Konformationsänderungen bei Aktivierung des Enzyms zu untersuchen.

2. Nachdem durch FRET gezeigt werden konnte, dass sich der Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit und der Aminoterminal der α -Untereinheit in räumlicher Nähe befinden, sollte weiterführend untersucht werden, ob es möglich ist, die Enzymuntereinheiten zwischen diesen beiden Termini mittels eines fluoreszierenden Proteins zu fusionieren. Diese Fusionsproteine sollten in Bezug auf ihre enzymatische Funktionalität sowie ihre fluoreszenten Eigenschaften untersucht werden.

3. Mithilfe der fluoreszenzmarkierten Untereinheiten und der fluoreszenten Fusionsproteine sollte die subzelluläre Lokalisation des Enzyms sowie mögliche isoformspezifische Unterschiede ermittelt werden. Darüber hinaus sollten, mithilfe der fluoreszierenden Enzymvarianten, mögliche Interaktionspartner der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase identifiziert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Substanzen

[α - ³² P]-GTP	Hartmann Analytic (Braunschweig)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V	Roth (Karlsruhe)
Aluminiumoxid	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumpersulfat	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen)
Avidin	IBA Biotagnology (Göttingen)
Ataciguat (HMR 1766)	Sanofi-Aventis (Frankfurt)
BAY 41-2272	Alexis (Lausen, CH)
Benzamidin	Fluka (Buchs, CH)
Bluo-gal	Invitrogen (Karlsruhe)
Brilliantblau G 250	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe)
cGMP	Sigma (Deisenhofen)
Cinaciguat (BAY 58-2667)	Bayer (Wuppertal)
GTP	Sigma (Deisenhofen)
DEA/NO	Sigma (Deisenhofen)
dNTP	Fermentas (St. Leon-Rot)
DMSO	Roth (Karlsruhe)
DTT	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Applichem (Darmstadt)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol (96 %)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (100 %)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)

Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
GTP	Sigma (Deisenhofen)
Hefe-Extrakt	Roth (Karlsruhe)
IBMX	Sigma (Deisenhofen)
IPTG	Sigma (Deisenhofen)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Kreatinphosphat	Sigma (Deisenhofen)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
β -Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
NaOH	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Roth (Karlsruhe)
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Perchlorsäure	Merck (Darmstadt)
Ponceau S	Sigma (Deisenhofen)
Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)	Roche (Mannheim)
Protoporphyrin IX	Sigma (Deisenhofen)
<i>Strep</i> -Tactin [®] Superflow [®] high capacity	IBA Biotagnology (Göttingen)
TEA/HCl	Sigma (Deisenhofen)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Tetracyclin	Sigma (Deisenhofen)
Tris-HCl	Roth (Karlsruhe)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Tween20	Merck (Darmstadt)
YC-1	Sigma (Deisenhofen)
Zinkacetat	Merck (Darmstadt)

3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Acryl-/Bisacrylamid – Lösung	Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe)
Blocking-Puffer	5 % Milchpulver (w/v) in TBST
Bradford Reagenz	Roti® Quant (Roth, Karlsruhe)
Coomassie Färbelösung	0,02 % Brilliantblau G 250 (w/v); 5 % Aluminiumsulfat-(14- 18)-Hydrat (w/v); 10 % Ethanol (96 %) (v/v); 2 % ortho- Phosphorsäure (w/v)
Coomassie Enfärbelösung	10 % Ethanol (96 %) (v/v); 2 % ortho-Phosphorsäure (w/v)
6 x DNA-Probenpuffer	10 mM Tris; 60 mM EDTA; 60 % Glycerin; 0,03 % Brom- phenolblau; 0,03 % Xylencyanol; pH 7,6
DNA Standard	GeneRule™ 1 kb DNA Ladder; Fermentas (St. Leon-Rot)
Fetales Rinderserum	PAA (Cölbe)
Gentamycin	50 mg/ml; Invitrogen (Karlsruhe)
Kanamycin	50 mg/ml; Sigma (Deisenhofen)
LB Agar	LB Medium + 1,5 % Agar (w/v)
LB Medium	1 % Trypton (w/v); 0,5 % Hefeextrakt (w/v); 1 % NaCl (w/v); pH 7,0
PBS	1,7 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 150 mM Natriumchlorid; 5,2 mM di-Natriumhydrogenphosphat; pH 7,4
Penicillin /Streptomycin	100 x; PAA (Cölbe)

Ponceau S Färbelösung	0,5 % Ponceau S (w/v); 1 % Eisessig (v/v)
Proteinstandard	PageRuler™ unstained; Fermentas (St. Leon-Rot)
5 % Sammelgel (2 Gele)	2,9 ml Reinstwasser 5 ml 2 x Sammelgelpuffer 2 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamid-Lösung 6 µl TEMED 120 µl 10 % Ammoniumpersulfat
2 x Sammelgelpuffer	0,25 M Tris; 0,2 % SDS (w/v); pH 6,8
10 x SDS Laufpuffer	0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS (w/v); H 8,3-8,8
2 x SDS Probenpuffer	0,15 M Tris; 1,2 % SDS (w/v); 30 % Glycerin (v/v); 15 % β-Mercaptoethanol (v/v); 0,018 % Bromphenolblau (w/v); pH 6,8
Sf-900II SFM-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
SOC Medium	1 % Tryptone (w/v); 0,5 % Hefeextrakt (w/v); 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose
<i>Strep</i> -Waschpuffer	100 mM Tris, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 10 mM DTT; pH 8,0
<i>Strep</i> -Elutionspuffer	100 mM Tris, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 10 mM DTT, 2,5 mM D-Desthiobiotin; pH 8,0
<i>Strep</i> - Regenerationspuffer	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA; pH 8,0
Lösung I (MiniPrep)	50 mM Glucose; 25 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0
Lösung II (MiniPrep)	0,2 M NaOH; 1 % SDS (w/v)
Lösung III (MiniPrep)	3 M Kaliumacetat; 12 % Essigsäure (v/v)
TAE Puffer	40 mM Tris-Acetat; 0,1 mM EDTA; pH 8,0

10 x TBST	1,5 M NaCl; 100 mM Tris; 1% Tween 20 (v/v)
TEA Lysispuffer	50 mM TEA; 1 mM EDTA; 10 mM DTT; PIC; pH 7,4
10 x Transferpuffer	0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 0,2 % SDS (w/v); pH 8,3
8 % Trenngel (2 Gele)	7 ml Reinstwasser 3,75 ml 2 x Sammelgelpuffer 4 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamid-Lösung 15 µl TEMED 150 µl 10 % Ammoniumpersulfat
4 x Trenngelpuffer	1,5 M Tris; 0,4 % SDS (w/v); pH 8,8
Trypsin /EDTA	10 x Biochrom (Berlin)

3.1.3 DNA und Vektoren

pCR2.1-TOPO	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA3.1/V5/His-TOPO	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA3.1Zeo+	Invitrogen (Karlsruhe)
pFASTBAC-1	Invitrogen (Karlsruhe)
pECFP-C1	Clontech (Heidelberg)
pECFP-N1	Clontech (Heidelberg)
pEYFP-C1	Clontech (Heidelberg)
pEYFP-N1	Clontech (Heidelberg)

3.1.4 Enzyme und Reagenziensysteme

Kreatin-Kinase	Sigma (Deisenhofen)
Lipofectamine LTX	Invitrogen (Karlsruhe)
Lumi-Light ^{Plus} Western-Blot Substrat	Roche (Mannheim)
Lysozym	Sigma (Deisenhofen)
<i>Pfu</i> -turbo DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Plasmid Maxi Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Amsterdam, NL)
RNase A	Sigma (Deisenhofen)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
TOPO TA Klonierungsreagenziensystem	Invitrogen (Karlsruhe)

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von NEB (Schwalbach) bezogen.

3.1.5 Antikörper

Rabbit anti- β_1 sGC Antikörper (1:4000) von Sigma (Deisenhofen)
 Rabbit anti- α_1 sGC Antikörper (1:5000) von Sigma (Deisenhofen)
 Rabbit anti- α_2 sGC Antikörper (1:750) [149]
 Rabbit anti-GFP Antikörper (1:2000) von Clontech (Heidelberg)
 anti-Rabbit IgG HRP-linked Antikörper (1:2000) von Cell Signalling (Schwalbach)

3.1.6 Zellen

3.1.6.1 Bakterienstämme

Max Efficiency® DH10 BAC™ Competent Cells (Invitrogen)
F. mcrA Δ .(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139*
 Δ (*ara, leu*)7697*galU* *galK* λ .*rpsL* *nupG* /pMON14272 / pMON7124

One Shot® TOP 10 kompetente Zellen (Invitrogen)

F. mcrA Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR**recA1**araD139* Δ (*ara, leu*)7697*galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*

dam⁻/*dcm*⁻ Competent *E. coli* (NEB)

ara-14 *leuB6* *fhuA31* *lacY1* *tsx78* *glnV44* *galK2* *galT22* *mcrA* *dcm-6* *hisG4* *rfbD1*
R(zgb210::Tn10) Tet^S *endA1* *rpsL136* (Str^R) *dam13::Tn9* (Cam^R) *xyIA-5* *mtl-1* *thi-1*
mcrB1 *hsdR2*

3.1.6.2 Eukaryotische Zelllinien

HEK 293-Zellen

Sf9-Zellen

3.1.7 Oligonukleotide

P178 5'-ACA CCG GCT AAT AAG GAG GAA ACC AC-3'

P179 5'-ATC TAC CCC TGA GGC CTT GCC TAA GAA-3'

P141 5'-CCG ACA CCA TGT ACG GTT TTG TGA-3

P180 5'-GGG CCC AGT TTT CAT CCT GGT TTG TTT CCT-3'

P254 5'- CGT ACG AGG AAT TAG TGA AGG ATA TTT CTA -3'

P253 5'- CAA TAC CAC AAA ATG CCA AAT AAG -3'

P270 (BsrGI_a1_for) 5'- GAT CGT GTA CAA GAT GTT CTG CAG GAA GTT CAA -
3' P271 (Xba_a1_rev) 5'- GAT CGT CTA GAA TCT ACC CCT GAG GCC TTG CC-3'

P269 (Xba_a1_Stop_rev) 5'- GAT CGT CTA GAT TAA TCT ACC CCT GAG GCC
TTG CC-3'

M13/pUC_forward 5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3'

M13/pUC_reverse 5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3'

T66SY67Hazursense: 5'-CCA CCC TGA GCC ACG GCG TGC AGT GCT TC-3'

T66SY67Hazuranti: 5'-GAA GCA CTG CAC GCC GTG GCT CAG GGT GG-3'

Y146FV151lazursense: 5'-GAG TAC AAC TTC AAC AGC CAC AAC ATC TAT ATC
ATG GCC G-3'

Y146FV151lazuranti: 5'-CGG CCA TGA TAT AGA TGT TGT GGC TGT TGA AGT
TGT ACT C-3'

V225RL232Hazursense: 5'-CTG GAG TTC CGG ACC GCC GCC GGG ATC ACT
CAC GGC ATG-3'

V225RL232Hazardant: 5'-CAT GCC GTG AGT GAT CCC GGC GGC GGT CCG GAA CTC CAG-3'

3.1.8 Hilfsmittel und Geräte

Agarosegelkammern	SciePlas	Herolab (Wiesloch)
Analysenwaage	PT210	Sartorius (Göttingen)
Brutschrank (<i>E.coli</i>)	Kelvitron®t	Heraeus (Hanau)
Brutschrank (<i>Sf9</i>)	Stabilitherm	Thermo (Waltham, USA)
CO ₂ -Inkubator	InCusafe	Sanyo (Bad Nenndorf)
Digitalwaage	BP210D	Sartorius (Göttingen)
ECL Dokumentationsanlage	ChemiLux	Intas (Göttingen)
Elektrophorese-Apparatur	Mini-PROTEAN	Biorad (München)
Filterpapier	3MM	Biorad (München)
Fluoreszenz Spektrophotometer	Cary Eclipse	Varian (Palo Alto, USA)
FPLC	ÄKTA Purifier	GE Healthcare (München)
Gefrierschränke	-20 °C	Liebherr (Ochsenhausen)
Geldokumentationsystem	Gel IX Imager	Intas (Göttingen)
Geltrockner	Modell 583	Biorad (München)
Kühlschränke	4 °C	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühltruhe	-80 °C	GFL (Burgwedel)
Magnetrührer	KMO2 basic	IKA (Staufen)
Mikroskop	invers, ID03	Zeiss (Jena)
Nitrocellulose	Protran, 0,45 µm	Roth (Karlsruhe)
pH-Meter	766 Calimatic	Knick (Berlin)
Pipetten	P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson (Middleton, USA)
Pipettierhilfen	pipetus® akku	Hirschmann (Eberstadt)
Power Supply	PowerPac300	Biorad (München)
Power Supply	EV231	Peq Lab (Erlangen)
Reinraumwerkbank	Herasafe	Heraeus (Hanau)
Reinstwasseranlage	Ultra Clear	SG (Barsbüttel)
Schüttelinkubator (<i>Sf9</i>)	Excelsa E24	New Brunswick (Edison, USA)
Schüttelinkubator (<i>E.coli</i>)	Innova 4300	New Brunswick (Edison, USA)

Semi-Dry Elektrophoretischer Transfer	Sedec™ M	Peq Lab (Erlangen)
Spritzen	20 ml; 60 ml	B.Braun (Melsungen)
Spritzensterilfilter	0,45 µm; 0,2 µm	Sarstedt (Nümbrecht)
Szintillationsgefäße	20 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Szintillationszähler LS 6500	BeckmanCoulter	(Palo Alto, USA)
Thermocycler	Primus advanced	Peqlab (Erlangen)
Thermomixer	compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Fresco 21	Thermo (Waltham, USA)
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus	Bandelin (Berlin)
Umlauferhitzer	Proportional	Haake (Karlsruhe)
UV-Visible Spektrophotometer	Cary Scan 50	Varian (Palo Alto, USA)
UV-Visible Spektrophotometer	Nanophotometer	Implen (München)
Vortexer	MS3 basic	IKA (Staufen)
Wasserbad	Typ 1003	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge	Multifuge IS-R	Thermo (Waltham, USA)
Zentrifuge	Meagfuge 1.0R	Heraeus (Hanau)

Sämtliche Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur und für die Routinearbeiten wurden von Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transformation von DNA in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

Durch Behandlung von *E. coli*-Zellen mit CaCl_2 [150] können diese in einen transienten Zustand der „Kompetenz“ übergehen, währenddessen sie fremde DNA-Moleküle aufnehmen können. Plasmid-DNA, deren Aufnahme dem Bakterium aufgrund der damit erworbenen Antibiotika-Resistenz einen Selektionsvorteil bringt, kann so unabhängig von chromosomaler DNA repliziert werden. Zur Transformation wurden je 100 μl der „kompetenten“ *E. coli*-Zellen (Subtyp DH5) mit je 10 μl des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 45 sec bei 42 °C (Hitzeschock) und eine erneute Abkühlung der Proben für 2 min auf Eis. Im Anschluss an die Transformation wurde jede Probe mit 250 μl vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und für eine Stunde im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde dann auf geeigneten, antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C gelagert.

3.2.2 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*-Kulturen

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly verwendet [151]. Dazu wurden 4 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Bakteriensuspension abzentrifugiert und in 100 μl Lösung I resuspendiert. Zur Lyse der Bakterienzellen wurden 150 μl Lösung II hinzugefügt und das Gemisch 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden zur Fällung der Proteine 200 μl Lösung III hinzugegeben und der Ansatz wiederum 10 min inkubiert. Die denaturierten Proteine wurden durch eine Zentrifugation von 15 min bei 21000 x g vom Überstand getrennt. Die im Überstand befindliche DNA wurde mit 50 μl 3 M Natriumacetatlösung und 500 μl Isopropanol gefällt. Der Ansatz wurde 30 min bei 21000 x g zentrifugiert und das DNA Pellet anschließend mit 500 μl 70 % Ethanol gewaschen. Die isolierte DNA wurde in 30 μl destilliertem Wasser aufgenommen. Zur Herstellung größerer Mengen gereinigter DNA wurden 200 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit 200 μl der Minipräparationskultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator

(140 rpm) inkubiert. Die Aufarbeitung der Bakterienkultur erfolgte mithilfe des Plasmid-Maxi-Reagenziensystems (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Die aufgereinigte DNA wurde in destilliertem Wasser resuspendiert und photometrisch auf ihre Konzentration hin überprüft.

3.2.3 Analyse der präparierten Plasmid DNA

Zur Analyse isolierter Plasmid-DNA wurden 1-3 µg des Plasmids mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Dabei erfolgte die Auswahl der Endonukleasen so, dass nach gelelektrophoretischer Auftrennung der entstehenden DNA Fragmente über die Fragmentlängen eine eindeutige Aussage über Korrektheit des klonierten Plasmids getroffen werden konnte. Hierbei wurden möglichst viele verschiedene Restriktionsendonukleasen eingesetzt, um so eine umfassende Kontrolle des klonierten Plasmids zu erhalten. Zusätzlich wurden nach Überprüfung der Plasmid-DNA mithilfe von Restriktionsschnitten, die potenziell richtig klonierten Plasmide sequenziert. Dazu wurden 500 ng Plasmid-DNA mithilfe für die Überprüfung geeigneter Oligonukleotide bei der Firma GATC sequenziert.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Untersuchung der DNA-Fragmentlängen wurden die DNA Fragmente mit DNA Probenpuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese nach der Methode von Aaij und Borst (Aaij und Borst 1972) ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Agarose wurde in einer Endkonzentration von 1 % (w/v) in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V in einer Horizontalelektrophoresekammer in TAE-Laufpuffer. Die DNA Fragmente wurden auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und mit dem Geldokumentationssystem Gel IX ImagerTM dokumentiert. Mittels des mitgeführten DNA-Standards wurden die Größen der DNA-Fragmente bestimmt. Die gewünschten DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mithilfe des Gelextraktionskits nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.5 Gerichtete Mutation einzelner Nukleotide

Die Veränderung einzelner Nukleotide innerhalb der Plasmid-DNA wurde mithilfe des "QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis"-Reagenziensystems (Stratagene) durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird mittels synthetisierter Oligonukleotide, welche die veränderte DNA-Sequenz enthalten, eine PCR durchgeführt, sodass die neu synthetisierte Plasmid-DNA die veränderte Sequenz besitzt. Dabei liegt das neu synthetisierte Plasmid unmethyliert vor. Das unveränderte Ausgangsplasmid, dessen DNA methyliert ist, wird mithilfe einer methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease verdaut, sodass anschließend nur noch die modifizierte DNA-Sequenz vorhanden ist. Die Mutagenese wurde nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll durchgeführt. Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen mit nachfolgender Präparation der Plasmid-DNA. Danach wurde die Plasmid-DNA in Doppelbestimmung mit genspezifischen Oligonukleotiden sequenziert, um den erfolgreichen Nukleotidaustausch zu verifizieren.

3.2.6 Konstruktion von Expressionsplasmiden

Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte molekularbiologische Methoden sind ausführlich bei Sambrook und Russell beschrieben [152]. Im Allgemeinen wurde so verfahren, dass mithilfe von Restriktionsendonukleasen die entsprechenden DNA Fragmente aus Plasmiden ausgeschnitten und diese in zuvor durch Restriktionsendonukleasen linearisierte Vektoren durch Ligation eingebracht wurden. Für einen präparativen Verdau mit Restriktionsendonukleasen wurden 2-10 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl geschnitten. Pro µg DNA wurden zwei bis zehn definierte Einheiten (U) der Restriktionsendonukleasen und die vom Hersteller empfohlenen zehnfach konzentrierten Puffer verwendet. Die Reaktionsansätze wurden mit destilliertem Wasser auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt und bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Um eine Religation linearisierter Vektoren mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatreste an den Enden der DNA-Fragmente durch eine Behandlung mit einer alkalischen Phosphatase entfernt. Nach Inhibition der Restriktionsendonukleasen bei 65°C für 10 min erfolgte die Entfernung der 5'-Phosphatreste nach Angaben des Herstellers. Erforderte die Klonierungsstrategie das Auffüllen von 5'-überhängenden Enden zu

glatten Enden, so wurden dem Reaktionsansatz 1,25 U *Pfu*-Turbo-Polymerase, 0,4 mM eines dNTP-Mixes sowie die benötigte Menge eines zehnfach konzentrierten *Pfu*-Reaktionspuffers hinzugegeben. Für die Auffüllreaktion wurde der gesamte Ansatz eine halbe Stunde bei 72 °C inkubiert. Die mit Restriktionsendonukleasen behandelten DNA-Fragmente wurden im Agarosegel elektrisch ihrer Größe nach getrennt. Definierte Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend aus dem sie umschließenden Gel extrahiert. Die extrahierten DNA-Fragmente wurden mittels Ligation über kompatible Enden miteinander verbunden, sodass ein zirkuläres DNA-Molekül entsteht. Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in fünf Ansätzen, wobei die Vektor-DNA mit steigenden Mengen des zu klonierenden Inserts gemischt wurde. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz nur mit Vektor-DNA und Ligase inkubiert. Die Ligation erfolgte in der Regel über Nacht bei Raumtemperatur. Im Folgenden ist die Konstruktion der verwendeten Plasmide beschrieben, wobei darauf Wert gelegt wurde die Zusammensetzung der Plasmide nachvollziehbar, zu machen.

Fusion von fluoreszierenden Proteinen an die α_1 -Untereinheit:

Die α_1 -Untereinheit wurde mittels PCR aus Herz-cDNA der Ratte amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer verwendet: P178 5'-ACA CCG GCT AAT AAG GAG GAA ACC AC-3' und P179 5'-ATC TAC CCC TGA GGC CTT GCC TAA GAA-3'. Das entstandene PCR Produkt wurde in den pcDNA3.1/V5/His-TOPO kloniert [153]. Aus diesem Plasmid wurde das Fragment kodierend für die α_1 -Untereinheit mit den Restriktionsenzymen HindIII/XhoI ausgeschnitten und in den HindIII/Sall geschnittenen pECFP-N1 Vektor gebracht. Die CFP markierte α_1 -Untereinheit (α_1 CFP) wurde NheI/XbaI in SpeI/XbaI des Transfervektors pFASTBAC kloniert. Im pFASTBAC Vektor wurde das CFP durch YFP aus dem pEYFP-N1 Vektor ausgetauscht unter Verwendung der Restriktionsenzyme AgeI/XbaI. Für die Klonierung der aminoterminal CFP markierten α_1 -Untereinheit wurde die α_1 -cDNA aus pcDNA3.1/V5/His-TOPO BsrGI/XbaI in den pECFP-C1 Vektor gebracht. Das entstandene CFP α_1 Konstrukt wurde XbaI/NheI in den XbaI geschnittenen pFASTBAC Vektor gebracht. Im pFASTBAC Vektor wurde, unter Verwendung einer BsrGI Schnittstelle, das CFP durch YFP in einer ungerichteten Klonierung ausgetauscht. Die richtige Orientierung des EYFP-Gens wurde durch Sequenzierung sichergestellt.

Fusion von fluoreszierenden Proteinen an die α_2 -Untereinheit:

Die α_2 -Untereinheit der Ratte wurde aus dem bereits beschriebenen Konstrukt α_2 in pFASTBAC [154] BamHI/SspI in BglII/BamHI des pEYFP-N1 Vektors kloniert. Dabei wurden die 5' überhängenden Enden der BamHI Schnittstelle im pEYFP-N1 wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben aufgefüllt und mit den glatten Enden der SspI Schnittstelle ligiert. In folgenden Klonierungen wird diese Vorgehensweise als *Pfu*-Auffüllreaktion gekennzeichnet. Die cDNA der α_2 -Untereinheit aus dem pEYFP-N1 Vektor wurde Eco47III/NotI in pECFP-N1 kloniert. Das entstandene α_2 CFP Konstrukt wurde Eco47III/NotI in den StuI/NotI behandelten pFASTBAC Vektor gebracht. Im Transfervektor pFASTBAC wurde ECFP durch EYFP mit den Restriktionsendonukleasen AgeI/KpnI ausgetauscht. Für die Klonierung der aminoterminal markierten α_2 -Untereinheit wurde die α_2 cDNA BstEI (*Pfu*-Auffüllreaktion)/BamHI aus dem pFASTBAC Vektor [154] in EcoRI (*Pfu*-Auffüllreaktion)/BamHI des pEYFP-C1 Vektors kloniert. Das entstandene YFP α_2 Konstrukt wurde AgeI/SpeI in den AgeI/XbaI behandelten pFASTBAC Vektor gebracht. Im pFASTBAC Vektor wurde EYFP durch ECFP aus dem CFP β_1 Konstrukt mithilfe der AgeI/BstI Schnittstellen ausgetauscht.

Fusion von fluoreszierenden Proteinen an die β_1 -Untereinheit:

Die cDNA der β_1 -Untereinheit wurde durch RT-PCR aus Rattenherzen mittels cDNA Polymerase Mix (Clontech) amplifiziert [153]. Dabei wurden folgende Primer verwendet: P141 5'-CCG ACA CCA TGT ACG GTT TTG TGA-3 und P180 5'-GGG CCC AGT TTT CAT CCT GGT TTG TTT CCT-3'. Das entstandene PCR-Produkt wurde in den pcDNA3.1/V5/His-TOPO Vektor kloniert [153]. Aus diesem Konstrukt wurde die β_1 -cDNA mittels der Restriktionsenzyme HindIII/ApaI in den pEYFP-N1 Vektor kloniert. Das entstandene β_1 YFP Konstrukt wurde SpeI/XbaI aus dem pEYFP-N1 Vektor in den pFASTBAC Vektor gebracht. Anschließend wurde EYFP mit ECFP aus dem pECFP-N1 Vektor AgeI/XbaI ausgetauscht. Außerdem wurde β_1 YFP SalI/XbaI in pECFP-N1 gebracht um ein CFP β_1 YFP Konstrukt zu erhalten. Von CFP β_1 YFP wurde der EYFP-kodierende cDNA Abschnitt SmaI/NotI deletiert und das Plasmid religiert um ein CFP β_1 Konstrukt zu erhalten. Der ECFP-kodierende cDNA Abschnitt aus CFP β_1 wurde NheI/EcoRI mit EYFP aus pEYFP-C1 ausgetauscht. Die entstandenen CFP β_1 und YFP β_1 Konstrukte wurden NheI/XbaI in

den SpeI/XbaI geschnittenen pFASTBAC Vektor gebracht. Das CFP β_1 YFP Konstrukt wurde SpeI/NotI in NheI/NotI pFASTBAC kloniert.

Konstruktion des FRET-basierten cGMP-Sensors YFP-GAFA-CFP:

Die cDNA kodierend für die GAF A Domäne der humanen Phosphodiesterase 5 wurde durch PCR aus humaner Placenta cDNA (Clontech) amplifiziert. Dafür wurden folgende Primer verwendet: P254 5'- CGT ACG AGG AAT TAG TGA AGG ATA TTT CTA -3' und P253 5'- CAA TAC CAC AAA ATG CCA AAT AAG -3'. Das entstandene PCR Fragment wurde in den pCR4 TOPO Vektor kloniert. Aus dem pCR4 TOPO Vektor wurde anschließend ein 500 bp Fragment AgeI/EcoRI ausgeschnitten und in den pECFP-N1 Vektor gebracht. Das entstandene GAFA-CFP Konstrukt wurde BsiWI/NotI in den BsrGI/NotI behandelten pEYFP-N1 Vektor gebracht. Das entstandene YFP-GAFA-CFP Konstrukt wurde anschließend EcoRI/NotI in den pFASTBAC Vektor kloniert.

Konstruktion fluoreszenzmarkierter sGC $\beta_1\alpha$ Fusionskonstrukte:

Durch PCR wurde ein Fragment kodierend für die α_1 -Untereinheit der Ratte aus dem pcDNA3.1/V5/His-TOPO Vektor amplifiziert. Dabei wurden die verwendeten Primer so hergestellt, dass sie interne Restriktionsschnittstellen enthielten. Folgende Primer wurden verwendet: P270 (BsrGI_a1_for) 5'- GAT CGT GTA CAA GAT GTT CTG CAG GAA GTT CAA -3' und P271 (Xba_a1_rev) 5'- GAT CGT CTA GAA TCT ACC CCT GAG GCC TTG CC-3', und P269 (Xba_a1_Stop_rev) 5'- GAT CGT CTA GAT TAA TCT ACC CCT GAG GCC TTG CC-3'. Das entstandene PCR Produkt wurde in den pCR2.1 TOPO Vektor kloniert. Durch die Primerkombination P270/P271 wurde ein Konstrukt mit Stop-Codon geschaffen, während die Primerkombination P270/P272 ein Konstrukt ohne Stop-Codon hervorbrachte. Anschließend wurde die cDNA kodierend für die α_1 -Untereinheit BsrGI/XbaI in den β_1 YFP in pEYFP-N1 Vektor gebracht. Dadurch entstand ein β_1 YFP α_1 Konstrukt. Das entsprechende Konstrukt ohne Stop-Codon wurde verwendet um carboxyterminal der α_1 -Untereinheit ECFP anzufügen. Dafür wurde das β_1 YFP α_1 Konstrukt NheI/XbaI in den pECFP-N1 Vektor gebracht. Da das ECFP Gen noch nicht im selben Leseraster wie β_1 YFP α_1 war wurde das Konstrukt SacII/SalI geschnitten und zur Herstellung glatter Enden mit der Mung Bean Nuklease behandelt. Anschließend wurden die glatten Enden religiert, was dazu führte, dass das ECFP im selben Leseraster wie

β_1 YFP α_1 war. Die entstandenen β_1 YFP α_1 CFP und β_1 YFP α_1 Konstrukte wurden SpeI/XbaI in den pFASTBAC Vektor gebracht.

Zur Herstellung eines Fusionskonstruktes mit der α_2 -Untereinheit wurde das α_2 in pEYFP-N1 Konstrukt (siehe oben) mit BsrGI linearisiert und mit NheI partiell verdaut um ein 731 bp Fragment kodierend für das EYFP Gen herauszuschneiden. Der Rest des Plasmids (6334 bp), welches die α_2 -Untereinheit enthielt wurde mit einem 2684 bp Fragment aus dem NheI/BsrGI geschnittenen α_1 in pEYFP-N1 Vektor ligiert. Das entstandene Konstrukt enthielt β_1 , EYFP und α_2 in einem Leseraster und wurde β_1 YFP α_2 in pEYFP-C1 benannt. Aus dem Konstrukt α_2 in pEYFP-C1 (siehe oben) wurde ein 297 bp Fragment bestehend aus der α_2 cDNA direkt vor dem Stop-Codon mit NheI/SspI herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde in den NheI/BamHI (*Pfu*-Auffüllreaktion) behandelten pECFP-N1 Vektor kloniert. Das entstandene Konstrukt („pECFP-N1 SspI“) wurde NheI geschnitten und ein 4692 bp Fragment kodierend für β_1 YFP α_2 aus dem ebenfalls NheI behandelten β_1 YFP α_2 Konstrukt eingefügt. Das entstandene Konstrukt enthielt β_1 , EYFP, α_2 und ECFP in einem Leseraster und wurde β_1 YFP α_2 CFP in pECFP-C1 benannt. Das β_1 YFP α_2 CFP Konstrukt wurde SpeI/NotI in den pFASTBAC Vektor gebracht. Im pFASTBAC Vektor wurde das β_1 YFP α_2 CFP Konstrukt NheI geschnitten und ein 400 bp Fragment aus dem NheI/SpeI behandelten β_1 YFP α_2 in pEYFP-C1 Konstrukt eingefügt. Dieses Konstrukt enthielt nun das natürliche α_2 Stop-Codon.

3.2.7 Herstellung des blau-fluoreszierenden Proteins Azurite durch gerichtete Mutation von GFP

Zur Herstellung des blau fluoreszierenden Proteins Azurite wurde das Gen kodierend für EGFP durch gerichtete Mutation verändert. Auf Basis des pEGFP-N1 Vektors (Invitrogen) wurden mithilfe von drei Primerpaaren (siehe 3.1.7 Primer) die Mutationen T66S, Y67H, Y146F, V151I, V225R und L232H eingefügt. Diese Veränderungen führten zu einem fluoreszierenden Protein bei dem das Anregungs- und Emissionsspektrum in den blauen Bereich des Spektrums verschoben ist [155-156].

3.3 Proteinbiochemische Methoden und Zellkultur

3.3.1 Proteinexpression im Sf9/Baculovirussystem

Das Sf9/Baculovirussystem ist eine gut etablierte und effiziente Methode zur Expression von großen Mengen rekombinanten Proteins. Die Proteinexpression im Sf9/Baculovirussystem gewährleistet korrekte posttranslationale Modifikation des rekombinanten Proteins und eignet sich dadurch besonders für die Untersuchung von biologisch aktiven Proteinkomplexen. Baculoviren, die zu der Familie *Baculoviridae* gehören, sind Viren mit doppelsträngiger zirkulärer DNA, die verschiedenste Insekten als Wirtsorganismus haben. Die Replikation und Transkription des Baculovirusgenoms findet im Zellkern des infizierten Wirtsorganismus statt. Im Zellkern wird das relativ große Baculovirusgenom (80-200 kb) in stabförmige Nukleokapside verpackt. Aufgrund der flexiblen Größe der Nukleokapside können diese auch große Mengen an fremder DNA beherbergen. Als Wirtszellen werden Insektenzellen verwendet, die für die Infektion durch Baculoviren sehr empfänglich sind. Die Sf9 Zelllinie ist eine immortalisierte Insekten-Zelllinie, die ursprünglich aus Ovarzellen der *Spodoptera frugiperda* Larve stammt, einer Mottenart, die zur Familie der Eulenfalter (*Noctuidae*) und zur Ordnung der Schmetterlinge (*Lepidoptera*) zählt. Sf9-Zellen können als Monolayer oder Schüttelkultur kultiviert werden.

Das Baculovirussystem basiert auf der Einführung eines fremden Gens in eine nichtessenzielle Region des Baculovirusgenoms durch homologe Rekombination mit einem Transfervektor. Die Herstellung von rekombinanten Baculoviren wurde mithilfe des BAC-TO-BAC Expressions-Systems (Invitrogen) durchgeführt. In diesem System wird ein modifiziertes Baculovirusgenom des *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) und der Transfervektor pFASTBAC verwendet. Das entsprechende Gen wird in den Transfervektor kloniert, dieser enthält flankierende Sequenzen die homolog zu Sequenzen im AcNPV-Genom sind. Der rekombinante Transfervektor wird in *E.coli* des Subtyps DH10BAC transformiert. Dieser *E.coli* Stamm enthält eine Bacmid-DNA und ein Helfer-Plasmid, das für Transpositionsproteine kodiert, die eine Rekombination des einklonierten Gens im Transfervektor mit dem Bacmid unterstützen. Durch den Einbau kommt es zu einer Zerstörung des *lacZ*-Gens auf dem Bacmid, wodurch diese Klone durch

Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden können. Die Bacmid-DNA dieser Klone wurde isoliert und mithilfe von bacmidspezifischen Oligonukleotiden in einer PCR die Rekombination der entsprechenden cDNA untersucht. Positive Bacmid-Klone wurden zur Transfektion von Sf9-Zellen verwendet. Nach einer Inkubation von vier bis fünf Tagen bei 27 °C konnten aus der transfizierten Sf9-Kultur rekombinante Baculoviren isoliert werden.

3.3.1.1 Kultivierung von Sf9-Zellen

Die Sf9-Zellen wurden im Brutschrank (New Brunswick) bei 27 °C und 140 rpm kultiviert. Wenn nicht anders angegeben wurde für die Kultivierung das serumfreie Medium Sf-900 II SFM (Invitrogen) verwendet. Dem Kulturmedium wurden Penicillin und Streptomycin (PAA) in einer Endkonzentration von 100 U/ml bzw. 100 µg/ml und fetales Rinderserum (PAA) in einer Endkonzentration von 10 % (v/v) zugesetzt. Unter optimalen Kulturbedingungen verdoppeln sich Sf9-Zellen alle 18-24 h. Zelldichten über 5×10^6 Zellen/ml wurden durch Zugabe von Kulturmedium vermieden.

3.3.1.2 Herstellung rekombinanter Baculoviren

3.3.1.3 Transposition der Konstrukte aus dem Transfervektor pFASTBAC in das Baculovirus-Genom

Für die Transposition der Konstrukte aus dem pFASTBAC Vektor in das Baculovirus-Genom wurden kompetente *E. coli*-Zellen vom Subtyp DH10BAC mit dem entsprechenden Konstrukt im pFASTBAC Vektor transformiert (siehe 3.2.1 Transformation von DNA in chemisch kompetente *E. coli* Zellen). Im Gegensatz zur Transformation von *E. coli*-Zellen des Subtyp DH5, wurden die DH10BAC-Zellen nach dem Hitzeschock mit 500 µl SOC-Medium für 4 h bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf Agarplatten ausplattiert, die 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, 10 µg/ml Tetracyclin, 300 µg/ml Bluo-gal und 40 µg/ml IPTG enthielten. Die ausplattierten Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert bis die Blau-Weiß-Differenzierung deutlich erkennbar war. Zur Isolierung von rekombinanter Bacmid-DNA wurden große, weiße Kolonien von den entsprechenden Platten ausgewählt und in 4 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, 10 µg/ml Tetracyclin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die

Präparation der Bacmid-DNA erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2 (Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*-Kulturen) beschrieben. Die Rekombination der cDNA der entsprechenden Konstrukte im pFASTBAC-Vektor mit dem Baculovirus-Genom wurde mithilfe von bacmidspezifischen Primern in einer PCR an diesen Bacmid-Präparationen überprüft (M13/pUC_forward: 5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3'; M13/pUC_reverse: 5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3').

3.3.1.4 Transfektion der Sf9-Zellen

Pro Transfektionsansatz wurden 1×10^6 Sf9-Zellen/ml in eine 35 mm Schale mit 2 ml Sf-900 II SFM Medium gegeben und für 1 h bei 27°C inkubiert. In dieser Zeit hefteten sich die Sf9-Zellen an den Schalenboden an und bildeten einen Monolayer. Für jede Transfektion wurden 1-2 µg der entsprechenden, positiven Bacmid-DNA in 100 µl Sf-900 II SFM Medium und 4 µl Cellfectin (Invitrogen) in 100 µl Sf-900 II SFM Medium hergestellt. In beiden Fällen wurde Sf-900 II SFM Medium ohne Antibiotika und fetales Rinderserum verwendet. Beide Lösungen wurden vereint und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Ansatz wurde anschließend 800 µl Sf-900 II SFM Medium ohne Antibiotika und fetales Rinderserum hinzugefügt. Die angehefteten Sf9-Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und die Mischung aus DNA und Cellfectin zugegeben. Die Zellen wurden 5 h bei 27°C inkubiert bevor die Transfektionsmischung abgenommen und durch 2 ml Sf-900 II SFM Medium ersetzt wurde. Nach 5 Tagen Inkubation bei 27 °C wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und für die Amplifikation des rekombinanten Virus benutzt.

3.3.1.5 Amplifikation der rekombinanten Viren

Zur Amplifikation des rekombinanten Virus wurden 200 ml einer Sf9-Kultur mit 1×10^6 Zellen/ml mit dem Zellkulturüberstand versetzt und bei 27 °C schütteln inkubiert. Täglich wurde aus der Kultur eine Probe entnommen und die Zellzahl und Vitalität der Zellen ermittelt. Die Zellen wurden so lange inkubiert, bis sich eine Vitalität von $\leq 40\%$ einstellte, was üblicherweise nach 4-6 Tagen der Fall war. Die Sf9-Kultur wurde dann bei 4000 x g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand als Viruslösung bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.1.6 Titerbestimmung der Viruslösungen

Zur Bestimmung des Titers der verwendeten Baculoviruslösungen wurde die Endpunktverdünnungsmethode nach Reed und Muench verwendet. Mit dieser Methode wird der TCID₅₀ Wert (*tissue culture infectious dose 50*) ermittelt, der angibt bei welcher Verdünnung 50 % der Kulturen infiziert sind [157]. Dieser TCID₅₀-Wert wird nach folgender Formel berechnet:

$$PD = (A-50) / (A-B)$$

$$\text{Log TCID}_{50} = V(A) - PD$$

- PD = proportionale Distanz des 50%-Signals zum Signal bei Verdünnung A
 V(A) = Exponent der Virusverdünnung A
 A = Prozentsatz des infizierten Wells der Virusverdünnung mit einer Infektiosität über 50%
 B = Prozentsatz des infizierten Wells der Virusverdünnung mit einer Infektiosität unter 50%

$$\text{TCID}_{50} = 10^{\text{Log TCID}_{50}}$$

Anhand des TCID₅₀ Werts lassen sich die „*plaque forming units*“ (pfu) nach folgender Formel berechnen:

$$\text{pfu} = 0,69 \times \text{TCID}_{50}.$$

- pfu = plaque forming unit
 Faktor = entsprechend dem Volumen der eingesetzten Virusverdünnung um auf 1 ml zu kommen

Dazu wurden 100 µl Sf9 Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen/ml in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte gegeben. Von den zu untersuchenden Virusüberständen wurden Verdünnungen zwischen 10^{-4} und 10^{-11} hergestellt und in acht Vertiefungen gegeben. In einer neunten Vertiefung blieb die Zellsuspension als Negativkontrolle uninfiziert. Nach 5 Tagen Inkubation bei 27 °C wurde die Morphologie der Sf9-Zellen mikroskopisch begutachtet und bestimmt, bei welcher Verdünnung es zu einer Infektion gekommen war. Eine ausführliche Erläuterung der Methode mit ihrer statistischen Basis findet sich bei Dougherty [158] und Hughes und Wood [159].

3.3.2 Infektion von Sf9-Zellen zur Herstellung von rekombinantem Protein

Zur Herstellung des rekombinanten Proteins wurden 10-20 ml einer Sf9 Schüttelkultur mit 2×10^6 Zellen/ml mit dem entsprechenden Baculovirusstämmen infiziert. Dabei wurde für die Infektionen ein Verhältnis von Viren (pfu) zu Zellen von 0,5-2 pfu/Zelle eingesetzt. Die infizierten Sf9-Zellen wurden anschließend für 72 h bei 27 °C und 140 rpm in einem 50 ml Erlenmeyerkolben inkubiert.

3.3.3 Kultivierung von HEK 293-Zellen

HEK 293 ist eine adhärent wachsende Tumorzelllinie humaner embryonaler Nierenzellen (*human embryonic kidney*). HEK 293-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit einer Glukosekonzentration von 4,5 g/l (high glucose) mit 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte alle 3-4 Tage nach Erreichen eines konfluenten Monolayers. Dazu wurden die Zellen mittels Trypsin / EDTA gelöst und in einem Verhältnis von 1:4 wieder ausgesät.

3.3.4 Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen

Die transiente Transfektion von HEK 293-Zellen erfolgte mithilfe des Transfektionsreagens Lipofectamine LTX (Invitrogen). Dazu wurden HEK 293-Zellen in 6-Well Platten bzw. 24-Well Platten mit Glasboden für die Untersuchung am inversen Mikroskop ausgesät und über Nacht kultiviert. Für die Transfektion wurden 0,5 µg Plasmid-DNA mit 50 µl Kulturmedium ohne fetales Kälberserum und Antibiotika vermischt. Nach Zugabe von 0,5 µl Plus-Reagent (Invitrogen) erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurde der Ansatz mit 1,5 µl Lipofectamine LTX Reagent vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz vorsichtig auf die Zellen gegeben. Bei der Kointransfektion von zwei Plasmid-DNA's wurden je 0,5 µg DNA verwendet und die Volumina des Plus-Reagents und des Lipofectamins verdoppelt.

3.3.5 Gewinnung des rekombinanten Proteins

Infizierte Sf9-Zellen bzw. transient transfizierte HEK 293-Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 x g für 5 min bei 4 °C geerntet. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Das Zellpellet wurde in eiskaltem TEA Lysispuffer aufgenommen und anschließend durch Ultraschall aufgeschlossen. Der Aufschluss der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurde das Zelllysate für 30 min bei 4 °C und 21000 x g zentrifugiert um die cytosolische Fraktion zu erhalten. Die cytosolische Fraktion wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für anschließende Experimente die Proteinkonzentration nach Bradford (siehe 3.3.6 Quantitativer Proteinnachweis) bestimmt. Für den Nachweis der rekombinanten Proteine mittels spezifischer Antikörper in Immunoblots wurden Aliquots der entsprechenden cytosolischen Fraktionen bei –80 °C eingefroren.

3.3.6 Quantitativer Proteinnachweis

Die quantitative Proteinanalyse erfolgte nach der Methode von Bradford [160]. Die Proteinbestimmung wurde mithilfe eines Kits der Firma Roth (Karlsruhe) vorgenommen. Dabei bilden Proteine Komplexe mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau, die über ihr Absorptionsmaximum bei 595 nm photometrisch quantifiziert werden können. Der Proteingehalt wurde über eine Kalibriergerade berechnet, die parallel zu den Proben mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt wurde. Zunächst wurde in einer 96-Loch-Platte eine BSA-Konzentrationsreihe zwischen 12,5 µg/ml und 200 µg/ml angefertigt. Die zu untersuchenden Proben wurden 1 : 10 oder 1 : 50 mit PBS verdünnt. Je 10 µl Standard und Probe wurden in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte gegeben und mit 190 µl Bradford Reagenz (Roti Quant®, Roth) aufgefüllt. Nach 10 min Inkubation wurde die Absorption der Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Mithilfe der Standardgeraden wurde aus diesen Werten die Gesamtproteinmenge in den Proben ermittelt.

3.3.7 Bestimmung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität

Die Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität beruht auf dem Nachweis von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ cGMP, welches durch die Umwandlung aus markiertem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP gebildet wird [161]. Zur Aktivitätsbestimmung wurden in der Regel 100 - 200 µg Protein in

einem 100 µl Ansatz für 10 min bei 37 °C in Anwesenheit von 0,025 mg Kreatinkinase, 50 mM TEA/HCl (pH 7,4), 1 mM IBMX, 3 mM MgCl₂, 5 mM Kreatinphosphat, 1 mM cGMP, 0,5 mM GTP und [α-³²P] GTP inkubiert. Durch die Zugabe von cGMP erhöht man nicht nur die Wiederfindungsrate von [α-³²P] cGMP, sondern verringert auch den durch Phosphodiesterasen abgebauten Anteil an [α-³²P] cGMP. Zur Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität unter stimulierten Bedingungen wurden den Ansätzen in unterschiedlichen Konzentrationen entweder DEA/NO und / oder Guanylyl-Cyclase-Modulatoren zugegeben. Zur Bestimmung der basalen Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde anstatt DEA/NO die entsprechende Menge 10 mM NaOH Lösung zu den Ansätzen gegeben. Zur genaueren Untersuchung von Enzymkomplexen, die ausschließlich basale Guanylyl-Cyclase-Aktivität aufwiesen wurde statt 3 mM MgCl₂ 3 mM MnCl₂ eingesetzt. Durch den Einsatz von MnCl₂ erhöht sich die basale Aktivität der Guanylyl-Cyclase. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 120 mM Zinkacetat-Lösung gestoppt und die 5'-Nukleotide durch Zugabe von 0,5 ml 120 mM Natriumcarbonat-Lösung mit dem entstehenden Zinkcarbonat kopräzipitiert [162]. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (8 min bei 14000 x g) abgetrennt, das durch die enzymatische Reaktion gebildete [α-³²P] cGMP verblieb im Überstand. In Säulen wurde Aluminiumoxid mit 2 ml 0,1 N Perchlorsäure angesäuert und 900 µl Überstand der Inkubationsansätze noch während der Ansäuerung zugegeben und das [α-³²P] cGMP an die Säule gebunden. Die Säule wurde zweimal mit 5 ml aqua dest. gespült. Anschließend wurde das [α-³²P] cGMP mit 5 ml 250 mM Natriumacetat (pH 6,5) in Szintillationsgefäße eluiert. Die Zerfallsrate pro Minute (cpm) des ³²P wurden durch Messung der Cerenkov-Strahlung in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt. Zur Berechnung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde bei jeder Versuchsreihe ein Ansatz ohne Protein mitgeführt. Durch diesen Leerwert wurde der Anteil an nicht-enzymatisch entstandenem [α-³²P] cGMP nachgewiesen. Anschließend wurde die Zählrate des Leerwertes von den Zählraten der Ansätze abgezogen. Die Wiederfindungsrate wurde in einigen Ansätzen durch den Einsatz von [α-³²P] cGMP anstatt [α-³²P] GTP bestimmt, da während der Probenaufbereitung ein Teil des cGMP mit dem entstehenden Zinkcarbonat kopräzipitierte bzw. nicht vollständig von den Aluminiumoxidsäulen eluiert werden konnte. Die Wiederfindungsrate wurde dann aus dem Verhältnis von isolierter zu eingesetzter Radioaktivität errechnet und lag bei 0,5 ± 0,05. Die Reinheit des [α-³²P] GTP lag bei

0,9. Die spezifische Aktivität der Guanylyl-Cyclase wurde als die Menge cGMP (in nmol), die von 1 mg Protein in 1 min gebildet wurde, nach folgender Formel berechnet:

$$v = \frac{(C - C_0)}{C_t} \times \frac{S}{W \times RG \times P \times t}$$

v	spez. Aktivität der Guanylyl-Cyclase (nmol cGMP x min ⁻¹ x mg Protein ⁻¹)
C	Zählrate der Probe (cpm)
C ₀	Zählrate des Leerwertes (cpm)
C _t	Zählrate des eingesetzten [α - ³² P] GTP (cpm)
S	Menge des eingesetzten Substrates 5'-GTP pro Ansatz (nmol)
W	Wiederfindungsrate von cGMP (bestimmt mit [³² P] cGMP, um Verluste durch Kopräzipitation mit ZnCO ₃ oder unvollständige Elution von der Säule zu quantifizieren)
RG	Reinheitsgrad des [α - ³² P] GTP
P	Proteinmenge pro Inkubationsansatz (mg)
t	Inkubationsdauer (min)

3.3.8 Western-Blot-Analyse

Für die Untersuchung rekombinant exprimierter Proteine wurden die Proteine cytosolischer Fraktionen mittels SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und mithilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen.

SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Die verwendeten SDS-Gele bestanden aus einem 5 % Sammelgel (0,25 M Tris; 0,2 % SDS (w/v); pH 6,8) und einem 8 % Trenngel (1,5 M Tris; 0,4 % SDS (w/v); pH 8,8). Zur Analyse von Proteinproben wurde zunächst ein SDS-Polyacrylamidgel angefertigt und in eine Elektrophoresekammer (Biorad) eingespannt. Die Elektrophoresekammer wurde im Anschluss mit 10 x SDS Laufpuffer (0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS (w/v); pH 8,3-8,8) gefüllt und der Probenaschenkamm aus dem Gel entfernt. Die Proben wurden mit dem 2 x SDS Probenpuffer (0,15 M Tris; 1,2 % SDS (w/v); 30 % Glycerin (v/v); 15 % β -Mercaptoethanol (v/v); 0,018 % Bromphenolblau (w/v); pH 6,8) gemischt und zur vollständigen Denaturierung der Proteine für 3 min bei 99 °C gekocht. Zwischen 30 μ g bis 90 μ g Protein wurden in eine der Probenaschen überführt. Parallel wurden 10 μ l des Proteinstandards (PageRuler unstained; Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 2 - 3 h.

Immunoblot-Analyse

Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Der Transfer erfolgte im semi-dry Verfahren in Transferpuffer für 2 h bei 350 mA. Die Kontrolle des Transfers erfolgte durch Färbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S. Dazu wurde die Membran für 2-5 min in Ponceau S Lösung inkubiert und mit aqua dest. solange gespült, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend erfolgte die Markierung des Proteinstandards direkt auf der Nitrozellulosemembran. Zum Entfernen der Färbelösung und zum Absättigen unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde die Membran für 1 h in 5 % Milchpulver (w/v) in 1 x TBST inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in 1 x TBST (je 10 min) folgte eine 60 minütige Inkubation des ersten Antikörpers in 1 x TBST. Nach erneutem Waschen (3 x 10 min mit 1 x TBST) erfolgte die Inkubation mit dem zweiten, HRP-markiertem Antikörper. Nach erneutem Waschen mit 1 x TBST erfolgte die Detektion der Proteine mithilfe des Lumi-Light^{Plus} Western-Blot Substrat (Roche) Reagenzien-Systems in einer ECL-Dokumentationsanlage (Intas).

3.4 Anreinigung rekombinanter Proteine aus Sf9-Zellen mittels *Strep*-Tactin Chromatographie

Das *Strep*-Tag Aufreinigungssystem basiert auf der hochselektiven Bindung von *Strep*-Tag II Fusionsproteinen an *Strep*-Tactin. Der *Strep*-Tag II ist ein Oktapeptid (WSHPQFEK) mit intrinsischer Bindungsaffinität gegenüber Streptavidin [163-166]. Rekombinante Proteine, die mit einem *Strep*-Tag II versehen sind, lassen sich quantitativ und ohne Aktivitätsverlust mithilfe von *Strep*Tactin-Sepharose aufreinigen [167]. Neben der spezifischen Bindung sind vor allem die sanften Elutionsbedingungen mittels des spezifischen Kompetitors Desthiobiotin vorteilhaft.

3.4.1 Herstellung der cytosolischen Fraktion aus Sf9-Zellen

Für die Anreinigung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase wurden 500 ml einer Sf9-Kultur mit einer Zelldichte von 2×10^6 Sf9-Zellen/ml mit der entsprechenden Virus-Lösung versetzt und 74 h bei 27 °C als Schüttelkultur inkubiert. Die Zellen wurden in 50 ml Röhrchen überführt und sedimentiert (4 °C, 4000 x g, 2 min). Die Sedimente wurden in 30 ml TEA Lysispuffer pH 7,4 mit 250 nM Avidin resuspendiert.

Die Zellen wurden viermal mit 16 sec mit 50 % maximaler Leistung im Ultraschall-Homogenisator auf Eis aufgeschlossen. Danach wurde die Suspension 30 min bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Die cytosolische Fraktion wurde durch Zentrifugation für 1 h bei 4 °C und 15000 x g von den Zellkernen, Membranen und restlichen Zellbestandteilen getrennt. Im Anschluss wurde die cytosolische Fraktion erst mit einem Membranfilter von 0,45 µm, dann mit einem Membranfilter von 0,2 µm Porengröße filtriert.

3.4.2 Affinitätschromatographie mittels *Strep*-Tactin

Die *Strep*-Tactin Chromatographie wurde mit einem ÄKTA® Purifier FPLC-System der Firma GE Healthcare durchgeführt. Die Beladung der Säulen mit cytosolischer Fraktion aus Sf9 Zellen, das Waschen der Säulen und die Elution von den Säulen wurden mittels der Absorption bei 280 nm, 430 nm (Soret Bande) und 515 nm (YFP Absorption) kontrolliert. Die Affinitätschromatographie wurde mit 4 ml *Strep*-Tactin® Superflow® high capacity in einer C 10/10 Säule mit dem Adapter AC 10 der Firma GE Healthcare durchgeführt. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurde die Säule mit zehn Säulenvolumina *Strep*-Waschpuffer äquilibriert. Cytosolisches Protein wurde auf die äquilibrierte *Strep*-Tactin®-Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit fünf Säulenvolumina *Strep*-Waschpuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgte mit fünf Säulenvolumina *Strep*-Elutionspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min. Das Elutionsvolumen wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Alle Fraktionen, die eine Absorption bei den oben genannten Wellenlängen zeigten, wurden vereinigt und auf Guanylyl-Cyclase-Aktivität hin untersucht. Im Anschluss erfolgte die Regeneration der *Strep* Tactin®-Säule mit 15 Säulenvolumina *Strep*-Regenerationspuffer und acht Säulenvolumina *Strep*-Waschpuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min.

3.5 Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

Als Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet man die strahlungsunabhängige Energieübertragung von einem angeregten Fluorophor (Donor) auf ein benachbartes zweites Fluorophor (Akzeptor). Die Grundzüge des FRET beschrieb Theodor Förster bereits 1948, weshalb man auch vom Förster-Resonanzenergietransfer spricht. Er postulierte, dass es neben der Fluoreszenz und

der Phosphoreszenz noch einen weiteren Weg geben müsse, bei dem abstandsabhängig die Energie eines angeregten Teilchens von einem Fluorophor auf ein zweites übertragen werden kann [168]. Die Theorie von Förster wurde später von L. Stryer und R. Haugland experimentell verifiziert. Sie konnten nachweisen, dass der Energietransfer vom Kehrwert der sechsten Potenz des Abstandes der beiden Fluorophore abhängt und schlugen vor diesen quantenmechanischen Prozess als „spektroskopisches Lineal“ zur Untersuchung von Abstandsverhältnissen oder Abstandsänderungen innerhalb biologische Moleküle einzusetzen [169]. FRET findet abhängig vom Fluorophorenpaar bei einem Abstand zwischen 10-80 Å statt. Neben dem relativen Abstand der beiden Fluorophore zueinander ist die Energieübertragung abhängig von der spektralen Überlappung der beiden Fluorophore. Ein strahlungsfreier Energietransfer kann nur stattfinden, wenn das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Da der Energietransfer auf Dipol-Dipol Wechselwirkungen zurückzuführen ist, ist die Energieübertragung abhängig von der Ausrichtung der Dipole der beiden Fluorophore. Diese Abhängigkeit wird in Form des Korrekturfaktors κ berücksichtigt. Wobei bei der praktischen Anwendung von FRET angenommen wird, dass die Fluorophore frei rotieren und alle Winkel statistisch gemittelt vorkommen, sodass $\kappa^2 = 2/3$ annimmt [170]. Spektrale Überlappung und Orientierung der Fluorophore werden bei der Berechnung des Förster-Radius R_0 berücksichtigt. Der Förster-Radius ist der Abstand, bei dem die Effizienz der Energieübertragung 50% beträgt. Der Förster-Radius ist spezifisch für ein bestimmtes Fluorophorenpaar, bewegt sich jedoch immer im Nanometerbereich [168, 171]. Er ergibt sich nach:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-23} \Phi_D \kappa^2 \eta^{-4} J(\lambda)$$

wobei gilt:

Φ_D ist die Fluoreszenzquantenausbeute.

κ^2 ist der Korrekturfaktor (siehe oben).

η ist der Brechungsindex, er beschreibt wie das Medium in dem sich die Fluorophoren befinden den Energietransfer beeinflusst. Für Wasser ergibt sich ein Wert von 1,33. Für Messungen in Zellen wird ein Wert von 1,4 angenommen.

$J(\lambda)$ beschreibt das Überlappungsintegral zwischen der Emission des Donors und der Absorption des Akzeptors.

Einer der wichtigsten Kennzahlen um FRET zu beschreiben ist FRET-Effizienz E . Die FRET-Effizienz E ist der Anteil der Energie des angeregten Donors, die auf den Akzeptor übertragen wird [169, 172]. Die FRET-Effizienz berechnet sich nach:

$$E = 1 / [1 + (r/R_0)^6]$$

wobei r den Abstand der Fluorophore zueinander beschreibt und R_0 der zuvor beschriebene Förster-Radius ist. Darüber hinaus kann die FRET-Effizienz als eine Funktion der Lebensdauer des angeregten Zustandes des Donors ausgedrückt werden [171]:

$$E = 1 - (\tau_{DA} / \tau_D)$$

wobei gilt:

τ_D ist die Lebensdauer des angeregten Zustandes des Donors in Abwesenheit des Akzeptors.

τ_{DA} ist die Lebensdauer des angeregten Zustandes des Donors in Anwesenheit des Akzeptors.

In einem typischen FRET Experiment werden biologische Moleküle mit geeigneten Fluorophoren verknüpft. Befinden sich die Fluorophore auf demselben Molekül, spricht man von *intramolekularem* FRET. Befinden sich die Fluorophore auf zwei unterschiedlichen Molekülen, spricht man von *intermolekularem* FRET. Findet zwischen den Fluorophoren FRET statt ist man in der Lage über die FRET-Effizienz Aussagen über den Abstand zwischen den Fluorophoren zu treffen. Ändert sich die Position der beiden Fluorophore zueinander, ändert sich die FRET-Effizienz und man kann Rückschlüsse auf die relative Lage und Bewegung der Fluorophore ziehen. In der biochemischen Forschung wird FRET verwendet um Faltung, Konformationsänderung oder Dimerisierung von Proteinen zu untersuchen (zur Übersicht siehe [173-174]). Dazu werden als Fluorophore oft fluoreszierende Proteine verwendet, die direkt mit dem zu untersuchenden Protein fusioniert werden. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* wurde von O. Shimomura 1961 als erstes beschrieben [175]. Durch die Weiterentwicklung des GFP und Entdeckung weiterer fluoreszierender Proteine aus Korallen entstand eine breite Palette fluoreszierender Proteine mit verschiedenen Eigenschaften [176]. Für die Entdeckung, Weiterentwicklung und Anwendung der fluoreszierenden Proteine wurde 2008 der Nobelpreis für Chemie an die drei Forscher O. Shimomura, M.

Chalfie und R. Tsien verliehen. Unter den verschiedenen Varianten des GFP, die das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichtes abdecken, gibt es auch eine Vielzahl von fluoreszierenden Proteinen, die sich als FRET-Paare eignen. Eines der meistverwandten FRET-Paare ist das cyan fluoreszierende Protein (*cyan fluorescent protein*, CFP) in Kombination mit dem gelb fluoreszierenden Protein (*yellow fluorescent protein*, YFP).

3.5.1 Sensitized emission FRET-Messung im Spektrofluorometer

Die FRET-Messung in cytosolischen Fraktionen von Sf9-Zellen erfolgte mittels der „*Sensitized Emission*“ Methode. Die Methode basiert auf der Messung der Fluoreszenzfraktion, die beim Auftreten von FRET vom Donor zum Akzeptor strahlungsfrei übertragen wird. Dazu wurden die Fluoreszenzintensitäten des Donors (Donor-Kanal), Akzeptors (Akzeptor-Kanal) und des Akzeptors nach Anregung des Donors (FRET-Kanal) gemessen [177]. Die cytosolischen Fraktionen von Sf9-Zellen wurden in einem Spektrofluorometer (Varian, Cary) bei 37 °C untersucht. Vor der FRET Messung wurden Fluoreszenzspektren im Scan-Modus aufgenommen, um Veränderungen des Spektrums aufgrund der Temperaturänderung zu überprüfen. Des Weiteren wurden die cytosolischen Fraktionen mit Lysis-Puffer verdünnt, um unspezifisches FRET aufgrund zu hoher Konzentrationen von fluoreszierenden Proteinen in einem begrenzten Volumen zu verhindern. Der FRET-Donor CFP wurde bei 436 nm auf der „blauen“ Seite des Anregungsspektrums von CFP angeregt um eine zu starke Anregung des Akzeptors zu vermeiden. Die Emission des Donors wurde bei 476 nm aufgenommen (Donor-Kanal). Der FRET-Akzeptor YFP wurde bei 515 nm angeregt, die YFP-Emission wurde bei 527 nm aufgenommen (Akzeptor-Kanal). Demzufolge wurde im FRET-Kanal der Donor bei 436 nm angeregt und die Fluoreszenzintensität bei 527 nm gemessen (FRET-Kanal). Zur Bestimmung des Anteils des Hintergrundes durch die Anregung von Zellbestandteilen an der Fluoreszenzintensität wurde in den drei Kanälen eine cytosolische Fraktion ohne fluoreszierende Proteine vermessen. Nach jeder FRET-Messung wurde die Proteinkonzentration der Probe bestimmt, um die entsprechende Hintergrundfraktion abzuziehen. Die Fluoreszenzintensität im FRET-Kanal setzt sich zusammen aus der Fraktion, die vom Donor auf den Akzeptor übertragen wird (FRET), und aus der Fluoreszenz, die der Donor in den FRET-Kanal „durchblutet“ (*donor bleed-through*)

bzw. aus der Fluoreszenz, die der Akzeptor nach direkter Anregung mit der Anregungswellenlänge des Donors in den FRET-Kanal emittiert (*acceptor bleed-through*). Zur Bestimmung der Fraktion, die vom Donor in den FRET-Kanal „durchblutet“ wurde eine reine CFP Probe im Donor-Kanal und im FRET-Kanal vermessen. Als Donor bleed-through Faktor konnte ein Wert von 0,446 bestimmt werden. Das heißt, dass ein Anteil von ca. 45 % der Fluoreszenzintensität des CFP im Donor-Kanal in den FRET-Kanal emittiert. Zur Bestimmung der Fraktion, die durch direkte Anregung des YFP in den FRET-Kanal emittiert wird, wurde reines YFP im Akzeptor-Kanal und FRET-Kanal vermessen. Als Akzeptor bleed-through Faktor konnte ein Wert von 0,0177 ermittelt werden. Das heißt, dass ca. 0,02 % der Fluoreszenzintensität vom YFP im Akzeptor-Kanal unspezifisch durch direkte Anregung bei der Anregungswellenlänge des Donors in den FRET-Kanal emittiert. Mithilfe der Fluoreszenzintensitäten aus den drei Kanälen und den ermittelten *bleed-through* Faktoren wurde das korrigierte FRET (FRET^{C}) nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{FRET}^{\text{C}} = \text{FRET} - (0,446 \times \text{CFP}) - (0,0177 \times \text{YFP}) \quad [178]$$

Dabei entsprechen FRET, CFP und YFP den hintergrundkorrigierten Fluoreszenzintensitäten im FRET, Donor und Akzeptor-Kanal. Das korrigierte FRET entspricht der Fraktion, die vom Donor auf den Akzeptor durch Energietransfer übertragen wird. Die ermittelten Werte für das korrigierte FRET sind jedoch von der Fluoreszenzintensität der Probe abhängig. Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, wurden aus den ermittelten FRET^{C} Werten die FRET-Effizienz (E) nach folgender Formel berechnet.

$$E = 1 - [\text{CFP} / (\text{CFP} + \text{FRET}^{\text{C}} \times Q_{\text{d}}/Q_{\text{a}})] \quad [179]$$

Dabei ist FRET^{C} das korrigierte FRET und CFP die hintergrundkorrigierte Fluoreszenzintensität im Donor-Kanal der Probe. Q_{d} bzw. Q_{a} sind die Quantenausbeuten des Donors CFP ($Q_{\text{d}} = 0,4$) und des Akzeptors YFP ($Q_{\text{a}} = 0,61$).

3.5.2 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Zur Untersuchung der fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten in Zellen, wurden HEK 293-Zellen 48 h nach transienter Transfektion in 24-well Glasbodenschalen mittels eines inversen Mikrokops (Nikon Ti) an einem Nikon A1 konfokalen Laser-Scanning Mikroskop-System analysiert. Die Untersuchungen erfolgten bei 37 °C und 5 % CO₂ mit einem 60x Ölimmersionsobjektiv (Nikon; Plan Apo VC; NA 1,4). Das blau fluoreszierende Protein Azurite wurde nach Anregung bei 405 nm (405 nm Diodenlaser, Melles Griot) mit einem 450/50 nm Bandpass Filter aufgenommen. Das cyan fluoreszierende Protein (CFP) wurde nach Anregung bei 457 nm (Argon-Laser, Melles Griot) mit einem 482/35 nm Bandpass Filter und das gelb fluoreszierende Protein (YFP) nach Anregung bei 514 nm (Argon-Laser, Melles Griot) mit einem 540/30 nm Bandpass Filter aufgenommen. Der Scanbereich hatte eine Größe von 512 x 512 Pixel, die optische Schichtdicke der konfokalen Aufnahmen betrug 0,35-0,7 µm. Zur Minimierung der Photoxizität wurde bei Aufnahmen über einen längeren Zeitraum die Controlled Light Exposure-Technik (CLEM) benutzt [180].

3.6 Statistische Auswertung

Alle Messdaten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$) von n unabhängigen Experimenten angegeben. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Daten wurde der Student t-Test verwendet. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung der FRET-Methode

Für die Untersuchung fluoreszenzmarkierter Enzymkomplexe mittels der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)-Methode wurden die fluoreszierenden Proteine und die fluoreszenzmarkierten Enzymvarianten in Sf9-Zellen exprimiert und anschließend in cytosolischer Fraktion mittels eines Spektrofluorometers vermessen. Zur Etablierung der FRET-Methode wurden rekombinante Baculoviren zur Expression der unfusionierten fluoreszierenden Proteine CFP (ECFP, Clontech), YFP (EYFP, Clontech) und der fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten erzeugt. Die in Sf9-Zellen exprimierten und bei 37 °C untersuchten fluoreszierenden Proteine zeigten die typischen aus der Literatur bekannten Anregungs- und Emissionsspektren (Abbildung 4).

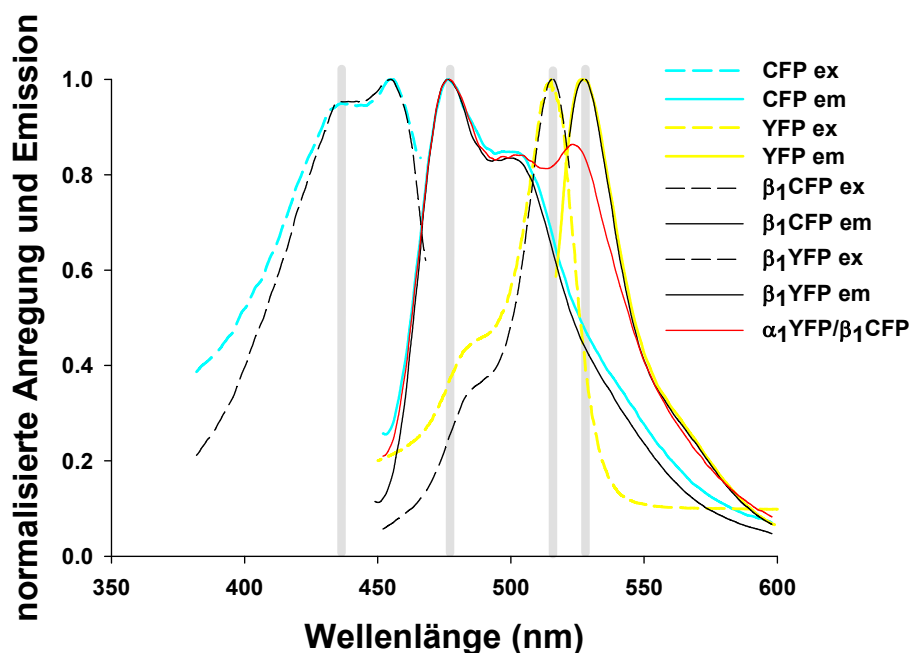


Abbildung 4: Normalisierte Anregungs- und Emissionsspektren von fluoreszierenden Proteinen und fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten

Anregungs- und Emissionsspektrum von CFP (cyan) und CFP markierter β_1 -Untereinheit (schwarz) und von YFP (gelb) und YFP markierter β_1 -Untereinheit (schwarz). Die Emissionsspektren von CFP wurden nach Anregung bei 436 nm aufgenommen. Emissionsspektren von YFP bzw. YFP markierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten wurden nach Anregung bei 515 nm aufgenommen. Die Anregungsspektren von CFP und YFP wurden aufgenommen, indem das Emissionsmaximum der fluoreszierenden Proteine festgelegt wurde (CFP 478 nm, YFP 527 nm) und nach der Wellenlänge, bei der die maximale Emission erreicht ist, gesucht wurde. Die rote Kurve zeigt das Emissionsspektrum der koexprimierten fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten nach Anregung bei 436 nm. Anregungs- und Emissionswellenlängen, die für die FRET-Untersuchungen genutzt wurden, sind mit grauen Balken unterlegt.

Anhand der Anregungs- und Emissionsspektren wurden die Anregungs- und Emissionswellenlängen für die „*Sensitized Emission*“ FRET-Untersuchung bestimmt (siehe Abbildung 4, Material und Methoden 3.5.1). Die Analyse von fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten zeigte, dass die spektralen Eigenschaften der fluoreszierenden Proteine durch die Fusion an die Guanylyl-Cyclase Untereinheiten nicht verändert wurden (siehe Abbildung 4). Um das Auftreten von FRET aufgrund von unspezifischen Interaktionen zwischen den fluoreszierenden Proteinen auszuschließen zu können, wurden CFP und YFP in Sf9-Zellen koexprimiert und im Spektrofluorometer untersucht. Darüber hinaus wurde einzeln exprimiertes CFP und YFP in verschiedenen Verhältnissen vermischt und anschließend vermessen. In beiden Versuchen trat kein FRET zwischen Donor- und Akzeptormolekül auf (Abbildung 5).

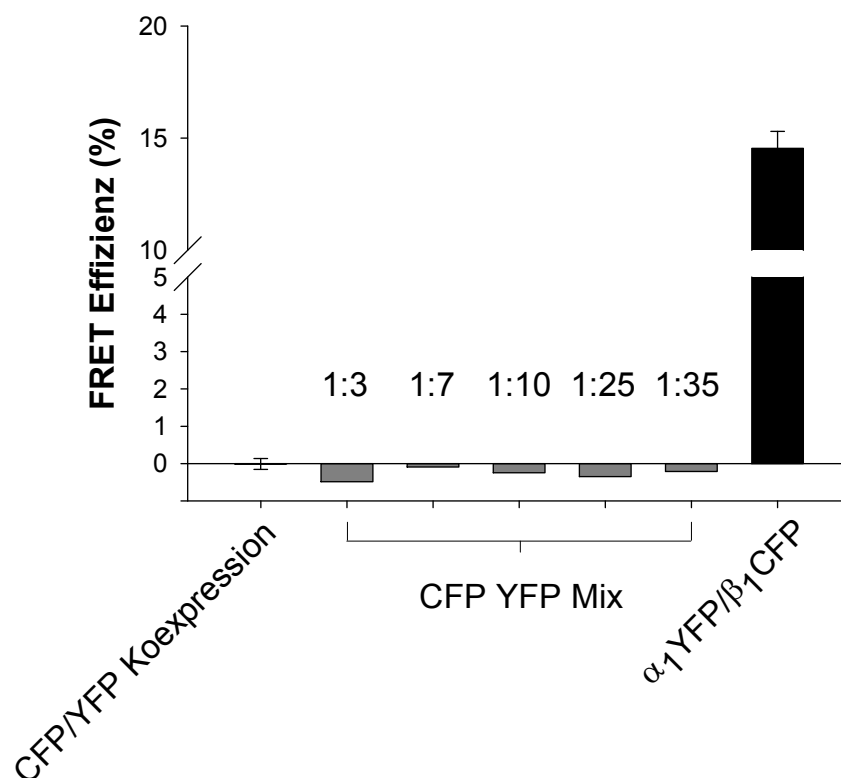


Abbildung 5: Koexpression und Vermischung von CFP und YFP führt zu keiner messbaren FRET-Effizienz

Die Koexpression von CFP und YFP in Sf9-Zellen führte zu keinem FRET in der entsprechenden cytosolischen Fraktion (weiße Säule). Eine Mischung aus einzeln exprimierten CFP bzw. YFP in verschiedenen Verhältnissen zeigte kein FRET (graue Säulen). Die Mischungsverhältnisse entsprechen den Fluoreszenzintensitäten im CFP bzw. YFP Kanal (CFP:YFP). Negative Werte der FRET-Effizienz können durch leichte Überschätzung der *bleed-through* Faktoren entstehen. Die Koexpression von fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten zeigte signifikant höheres FRET als die Negativkontrollen (schwarze Säule).

Nach der Koexpression von carboxyterminal YFP markierter α_1 -Untereinheit mit carboxyterminal CFP markierter β_1 -Untereinheit zeigte sich nach Anregung des FRET-Donors CFP bei 436 nm ein Emissionsspektrum mit zwei Emissionsmaxima (siehe Abbildung 4). Diese Veränderung des Emissionsspektrums im Vergleich zum reinen CFP deutet auf einen Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor hin. Nach Abzug der *bleed-through*-Fraktionen konnte gezeigt werden, dass die Koexpression der carboxyterminal markierten Enzymuntereinheiten zu einer signifikant höheren FRET-Effizienz als die Negativkontrollen führt (siehe Abbildung 5). Zur weiteren Überprüfung der spektrofluorometrischen FRET Messung im Sf9 Cytosol wurde ein FRET basiertes cGMP Sensor Konstrukt auf Basis der cGMP bindenden GAFA Domäne der Phosphodiesterase 5 konstruiert. Dabei wurde eine 500 bp lange Sequenz kodierend für die GAF A Domäne mit den Genen kodierend für YFP und CFP (5' YFP-GAFA-CFP 3') fusioniert. Das generierte Konstrukt ist vergleichbar mit dem cGMP Sensor cGES-DE5, der nach Zugabe von cGMP einen konzentrationsabhängigen FRET-Anstieg zeigt [181]. Nach Erzeugung eines rekombinanten Baculovirus wurde das YFP-GAFA-CFP Konstrukt in Sf9-Zellen exprimiert und in cytosolischer Fraktion bei 37°C untersucht (Abbildung 6). YFP-GAFA-CFP zeigte nach Anregung bei 436 nm ein Spektrum mit zwei Emissionsmaxima, bei 478 nm und 527 nm. Zugabe von cGMP zum Cytosol führte zu einer Abnahme der Emission bei 478 nm und Zunahme der Emission bei 527 nm, was für einen Anstieg des Energietransfers spricht (siehe Abbildung 6). Es konnte eine maximale FRET-Änderung von 16 % beobachtet werden. Weitere Untersuchungen zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit der FRET-Änderung mit einem EC_{50} von $0,38 \pm 0,02 \mu\text{M}$ cGMP. Versuche mit dem verwandten Botenstoff cAMP zeigten eine hohe Selektivität von cGMP gegenüber cAMP. cAMP führte zu einem konzentrationsabhängigen FRET-Anstieg mit einem EC_{50} von $452 \pm 49 \mu\text{M}$ cAMP, wobei auch bei maximalen cAMP Konzentrationen keine maximale FRET-Änderung hervorgerufen wurde (siehe Abbildung 6). Damit zeigt der YFP-GAFA-CFP cGMP-Sensor eine 1000-fach höhere Selektivität von cGMP gegenüber cAMP.

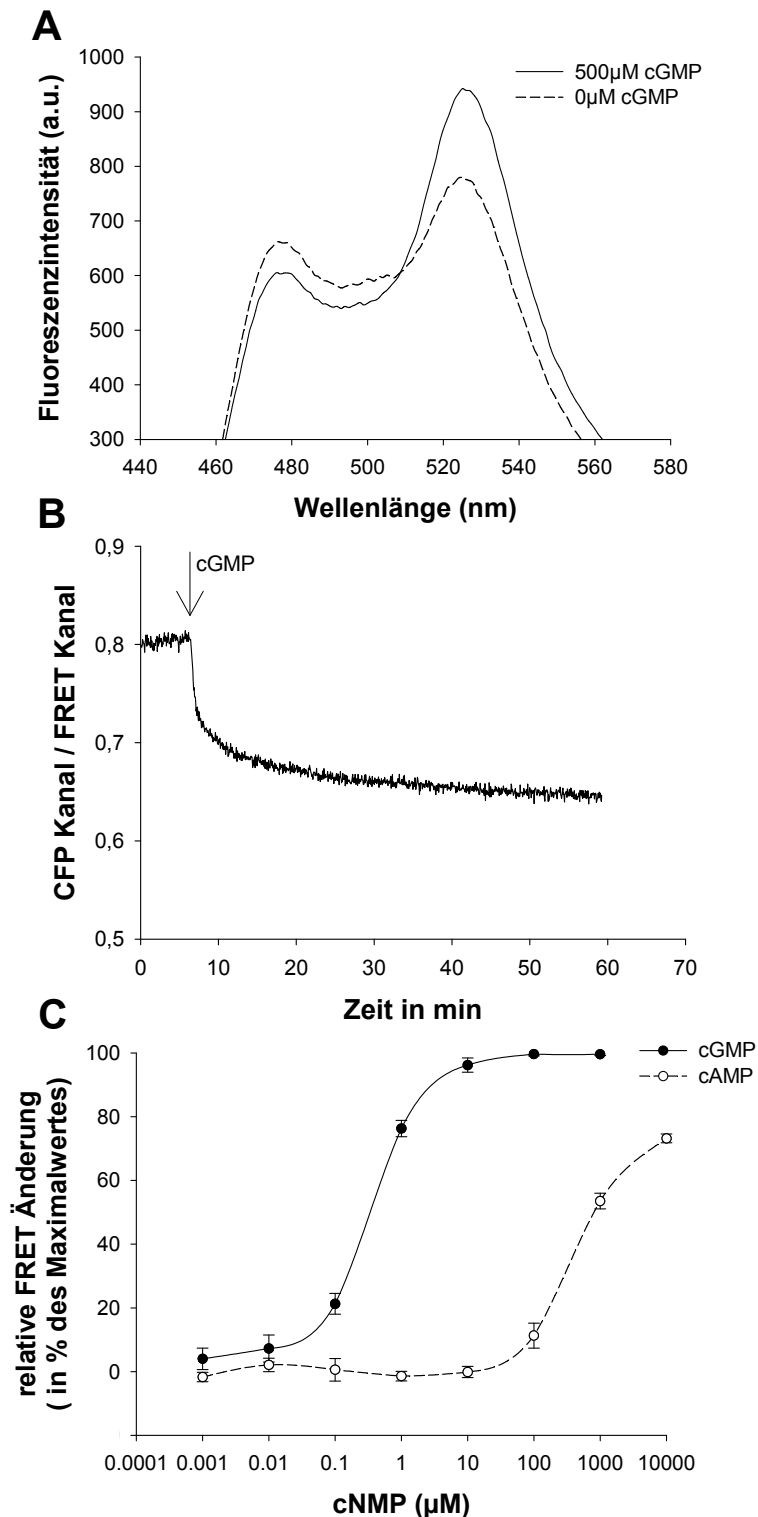


Abbildung 6: Der cGMP Sensor YFP-GAFA-CFP zeigt eine cGMP abhängige FRET-Änderung in cytosolischer Fraktion von Sf9-Zellen

A- Nach Anregung bei 436 nm wurden Fluoreszenzspektren von YFP-GAFA-CFP in cytosolischer Fraktion von Sf9-Zellen aufgenommen (gepunktete Linie). Die Zugabe von cGMP (Endkonzentration 500 µM) führte zu einer Veränderung des Spektrums mit Abnahme der Fluoreszenz bei 478 nm und Zunahme der Fluoreszenz bei 527 nm (durchgezogene Linie). **B-** Zeitlicher Verlauf der cGMP abhängigen FRET-Änderung des YFP-GAFA-CFP Konstruktes. Die cGMP abhängige FRET-Änderung ist dargestellt als Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten im CFP- und FRET-Kanal. Eine Abnahme des CFP/FRET Verhältnisses bedeutet eine Zunahme des FRET. **C-** Konzentrationsabhängige FRET-Änderung durch cGMP und cAMP.

4.2 Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Heterodimeren

Die vorangegangenen Untersuchungen an CFP und YFP und dem cGMP-Sensor YFP-GAFA-CFP zeigten, dass das gemessene FRET in cytosolischer Fraktion nach Überexpression in Sf9-Zellen auf dem spezifischen Energietransfer zwischen CFP und YFP beruht. Alle untersuchten Negativkontrollen zeigten kein FRET. Mittels des generierten cGMP Sensorproteins konnte gezeigt werden, dass eine durch Konformationsänderungen ausgelöste Veränderung des Abstands zwischen CFP und YFP in diesem Versuchsaufbau detektiert werden kann.

4.2.1 Expression der fluoreszenzmarkierten Untereinheiten im Sf9/Baculovirus System

Für Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten wurden die fluoreszierenden Proteine CFP und YFP auf molekularbiologischer Ebene an die Guanylyl-Cyclase Untereinheiten fusioniert. Dabei wurden Konstrukte generiert, bei denen das fluoreszierende Protein am Amino- oder Carboxyterminus der jeweiligen Guanylyl-Cyclase Untereinheit fusioniert wurde. Um beide Enzymisoformen zu untersuchen, wurden die β_1 -Untereinheit und die dimerisierenden Partneruntereinheiten α_1 und α_2 fluoreszenzmarkiert. Zur Expression der fluoreszenzmarkierten Untereinheit wurden rekombinante Baculoviren hergestellt. Die Expression der fluoreszenzmarkierten Untereinheiten im Sf9/Baculovirus System wurde nach elektrophoretischer Auftrennung mit spezifischen Antikörpern gegen die Guanylyl-Cyclase Untereinheiten nachgewiesen (Abbildung 7). Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass die fluoreszenzmarkierten Untereinheiten das erwartete Molekulargewicht aufweisen und im gleichen Ausmaß wie die nativen, unmarkierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten im Sf9/Baculovirus System exprimiert werden (siehe Abbildung 7).

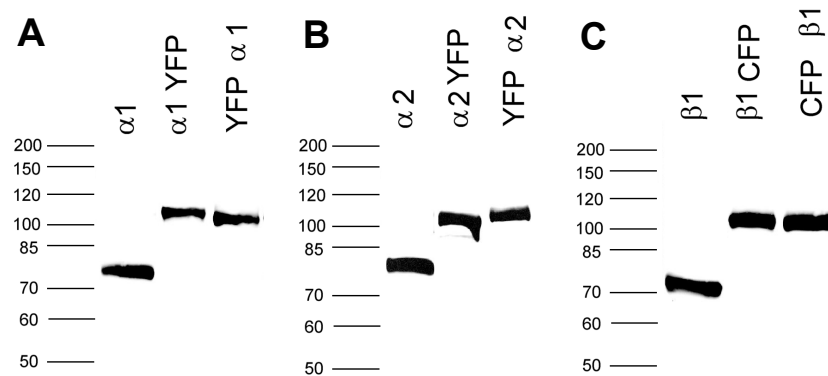


Abbildung 7: Expression nativer und fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Untereinheiten im Sf9/Baculovirus System

30 µg Protein aus cytosolischer Fraktion von entsprechend infizierten Sf9-Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper gegen die α_1 -Untereinheit (A), α_2 -Untereinheit (B) und β_1 -Untereinheit (C). Die rekombinant exprimierten Proteine konnten bei dem erwarteten Molekulargewicht detektiert werden (α_1 80 kDa, α_1 YFP 107 kDa, YFP α_1 104 kDa, α_2 82 kDa, α_2 YFP 108 kDa, YFP α_2 113 kDa, β_1 72 kDa, β_1 CFP 102 kDa, CFP β_1 101 kDa).

4.2.2 Messung der Enzymaktivität der fluoreszenzmarkierten Enzymvarianten

Nachdem die Expression der fluoreszenzmarkierten Untereinheiten bestätigt wurde, sollte überprüft werden, ob die Fusion der fluoreszierenden Proteine an die Guanylyl-Cyclase Untereinheiten die Bildung eines funktionellen Enzymkomplexes beeinträchtigen oder sogar verhindern. Zur Untersuchung von heterodimeren Enzymkomplexen wurden die fluoreszenzmarkierten Untereinheiten in Sf9-Zellen koexprimiert. Die Bildung eines funktionellen Enzyms wurde durch Messung der spezifischen Guanylyl-Cyclase Enzymaktivität untersucht (Abbildung 8). Die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität der nativen und fluoreszenzmarkierten Enzymkomplexe wurde unter basalen, NO stimulierten (100 µM DEA/NO) und NO/YC-1 stimulierten (100 µM DEA/NO, 10 µM YC-1) Bedingungen bestimmt. Koexpression carboxyterminal fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Untereinheiten führte zur Bildung eines basal aktiven sowie NO und NO/YC-1 stimulierbaren Enzymkomplexes (siehe Abbildung 8). Dieses Ergebnis konnte bei der α_1/β_1 sowie bei der α_2/β_1 Enzymisoform beobachtet werden. Auch die Koexpression carboxyterminal fluoreszenzmarkierter β_1 -Untereinheiten mit aminoterminal fluoreszenzmarkierten α_1 - bzw. α_2 -Untereinheiten führte zur Bildung eines basal aktiven sowie NO und NO/YC-1 stimulierbaren Enzymkomplexes (siehe Abbildung 8). Die gemessenen Enzymaktivitäten der fluoreszenzmarkierten

Guanylyl-Cyclase Varianten unterschieden sich nicht signifikant von denen der nativen Enzymkomplexe (siehe Abbildung 8).

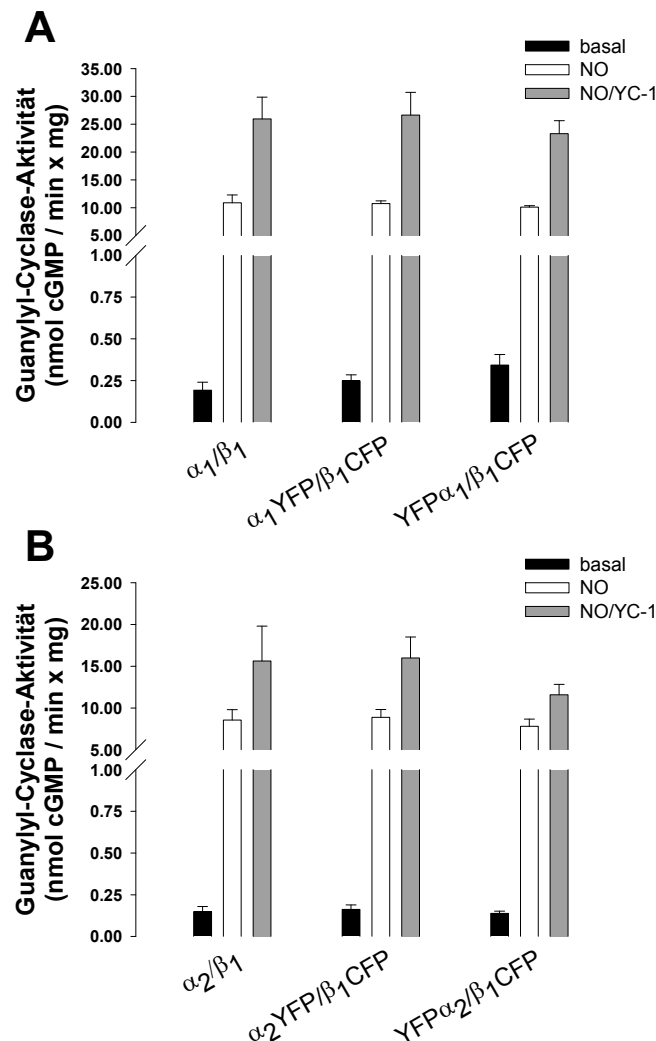


Abbildung 8: Messung der spezifischen Enzymaktivität nativer- und fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Varianten

Enzymaktivitäten wurden im Cytosol von Sf9-Zellen unter basalen (schwarze Säulen), NO-stimulierten (100 μ M DEA/NO, weiße Säulen) und unter NO/YC-1 stimulierten (100 μ M DEA/NO und 10 μ M YC-1, graue Säulen) Bedingungen bestimmt. **A-** Enzymaktivitäten der Guanylyl-Cyclase α_1 Enzymisoform und der entsprechenden fluoreszenzmarkierten Enzymvarianten. **B-** Enzymaktivitäten der Guanylyl-Cyclase α_2 Enzymisoform und der entsprechenden fluoreszenzmarkierten Enzymvarianten. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Untersuchung der spezifischen Enzymaktivität zeigte, dass eine Fusion am Carboxyterminus der β_1 - und α -Untereinheit keinen Einfluss auf die Bildung eines funktionellen Enzyms hat. Auch aminoterminal markierte α -Untereinheiten bildeten funktionelle Enzymkomplexe. Dagegen zeigten alle Kombinationen mit einer aminoterminal fluoreszenzmarkierten β_1 -Untereinheit nur eingeschränkte Enzymaktivität.

4.2.3 Untersuchung von Enzymvarianten mit aminoterminal markierter β_1 -Untereinheit

Zur näheren Untersuchung der Enzymvarianten mit einer aminoterminal fluoreszenzmarkierten β_1 -Untereinheit, wurde diese Untereinheit mit einer *Strep*-markierten α -Untereinheit koexprimiert und über *Strep*-Tag Chromatographie angereinigt. Die Proteine aus den angereinigten Fraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Coomassie blue angefärbt (Abbildung 9).

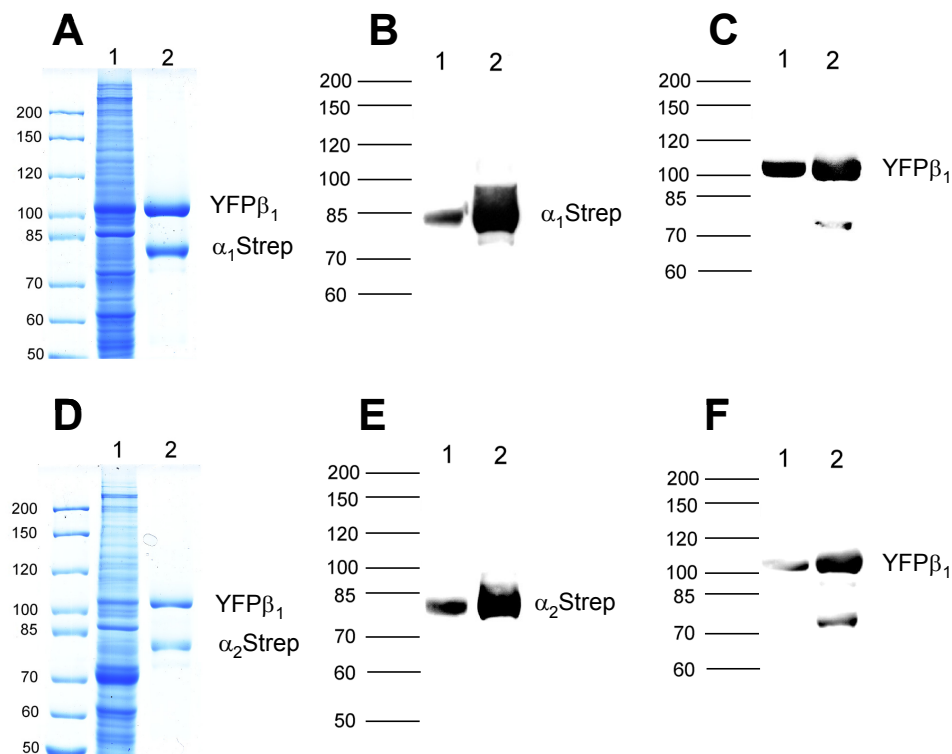


Abbildung 9: Expression und Anreinigung von Enzymvarianten mit einer aminoterminal markierten β_1 -Untereinheit

Die Enzymvarianten wurden in Sf9-Zellen exprimiert und aus cytosolischer Fraktion mittels *Strep*-Tag Chromatographie angereinigt. Cytosolische und angereinigte Fraktionen wurden elektrophoretisch getrennt und die Proteine mit Coomassie blue gefärbt und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Für die elektrophoretische Trennung wurden 30 μ g cytosolischer Fraktion und 1 μ g angereinigter Fraktion auf die Gele aufgetragen. **A-** Coomassie blue Färbung cytosolischer (1) und angereinigter (2) Fraktionen nach Koexpression von α_1 *Strep* und YFP β_1 . Die angefärbten Proteinbanden stimmen überein mit dem erwarteten Molekulargewicht der YFP β_1 -Untereinheit (101 kDa) und der *Strep*-markierten α_1 -Untereinheit (81 kDa). **B-** Immunoblot Detektion mit Antikörpern gegen die α_1 -Untereinheit in cytosolischer (1) und angereinigter (2) Fraktion. **C-** Immunoblot Detektion mit Antikörpern gegen die β_1 -Untereinheit in cytosolischer (1) und angereinigter (2) Fraktion. **D-** Coomassie blue Färbung cytosolischer (1) und angereinigter (2) Fraktion nach Koexpression von α_2 *Strep* und YFP β_1 . Die angefärbten Proteinbanden stimmen überein mit dem erwarteten Molekulargewicht der YFP β_1 -Untereinheit (101 kDa) und der *Strep*-markierten α_2 -Untereinheit (83 kDa). **E-** Immunoblot Detektion mit Antikörpern gegen die α_2 -Untereinheit in cytosolischer (1) und angereinigter (2) Fraktion. **F-** Immunoblot Detektion mit Antikörpern gegen die β_1 -Untereinheit in cytosolischer (1) und angereinigter (2) Fraktion.

In den angereinigten Fraktionen konnte die *Strep*-markierte α -Untereinheit sowie die aminoterminal markierte β_1 (YFP β_1) bei dem errechneten Molekulargewicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden die Guanylyl-Cyclase Untereinheiten im Cytosol und in angereinigter Fraktion mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen (siehe Abbildung 9). Die Anreinigung der aminoterminal fluoreszenzmarkierten β_1 -Untereinheit über den *Strep*-markierten Dimerisierungspartner zeigt, dass die Dimerisierung durch die aminoterminal Fusion an die β_1 -Untereinheit nicht beeinträchtigt wird. Die eingeschränkte Enzymaktivität ist daher nicht auf eine verminderte Dimerisierung der Enzymvarianten zurückzuführen. Zur weiteren Untersuchung des fluoreszenzmarkierten Enzymkomplexes wurden Absorptionsspektren des angereinigten Enzyms unter basalen und NO stimulierten (100 μ M DEA/NO) Bedingungen aufgenommen (Abbildung 10). Die spektrale Analyse des α_1 Strep/YFP β_1 Heterodimers zeigte ein Absorptionsmaximum bei 515 nm, welches auf die Absorption des YFP zurückzuführen ist. Das Absorptionsspektrum zeigte keine Soret Bande bei 430 nm, wie es für das hämhaltige Enzym typisch ist (siehe Abbildung 10).

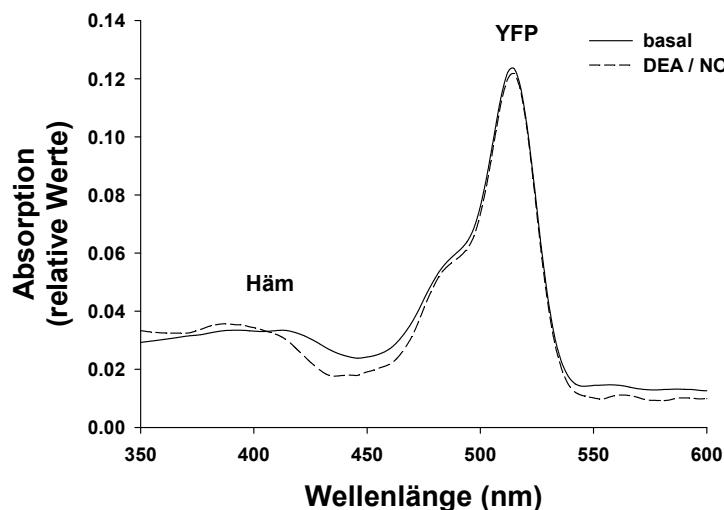


Abbildung 10: Spektrale Analyse der angereinigten α_1 Strep/YFP β_1 Enzymvariante

Absorptionsspektren der α_1 Strep/YFP β_1 Enzymvariante unter basalen (durchgezogene Linie) und NO-stimulierten (100 μ M DEA/NO, gepunktete Linie). Das Absorptionsmaximum bei 515 nm ist auf die Absorption des YFP zurückzuführen. Das angereinigte Enzym zeigte keine Soret Bande bei 430 nm.

Aus diesem Grund kann man darauf schließen, dass die Fusion des fluoreszierenden Proteins an den Aminoterminus der β_1 -Untereinheit den Einbau des Häms in das Enzym beeinträchtigt. Die Messung der Enzymaktivität der α_1 Strep/YFP β_1 Enzymvariante zeigte, dass der Enzymkomplex basale Aktivität aufweist, aber nicht

durch NO stimulierbar ist (Abbildung 11). Um die basale Aktivität zu erhöhen erfolgte die Messung zusätzlich in Gegenwart von Mn^{2+} . Die fehlende NO-Stimulierbarkeit ist durch das Fehlen von Häm im Enzym erklärbar. Überraschenderweise war der Enzymkomplex auch nicht durch den hämunabhängigen Guanylyl-Cyclase-Aktivator Cinaciguat aktivierbar (siehe Abbildung 11).

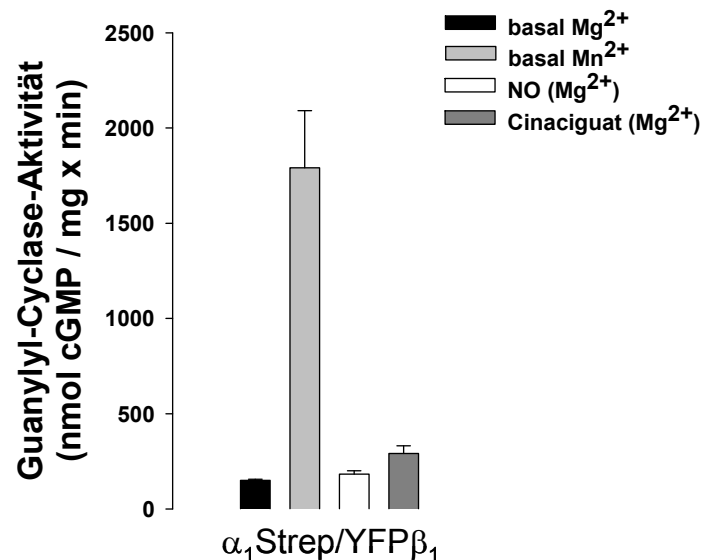


Abbildung 11: Messung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität angereinigter α_1 Strep/YFP β_1 Enzymvariante

Enzymaktivitäten des angereinigten Enzyms wurden unter basalen Bedingungen in Gegenwart von Mg^{2+} (schwarze Säule), oder Mn^{2+} (graue Säule) bestimmt. Außerdem wurden Enzymaktivitäten in Gegenwart von Mg^{2+} unter NO stimulierten (100 μ M DEA/NO, weiße Säule) Bedingungen und in Gegenwart von 10 μ M Cinaciguat (dunkel graue Säule) bestimmt. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Untersuchungen mit angereinigten Enzymvarianten zeigen, dass die Fusion von einem fluoreszierenden Protein an den Aminoterminus der β_1 -Untereinheit zwar den Einbau von Häm, jedoch nicht die Bildung eines basal aktiven, heterodimeren Enzymkomplexes einschränkt.

4.2.3 FRET-Untersuchung an fluoreszenzmarkierten Enzymvarianten

Die Untersuchungen der fluoreszenzmarkierten Enzymvarianten zeigten, dass die Fusion der fluoreszierenden Proteine an die Amino- und Carboxytermini der Guanylyl-Cyclase Untereinheiten keinen Einfluss auf die Bildung eines heterodimeren Enzymkomplexes hat. Nun sollte mithilfe der FRET-Methode untersucht werden ob sich die fluoreszierenden Proteine an den Guanylyl-Cyclase Untereinheiten in ausreichend räumlicher Nähe für einen Energietransfer (< 80 Å)

befinden. Dazu wurden die fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten in verschiedenen Kombinationen in Sf9-Zellen koexprimiert und in cytosolischer Fraktion bei 37 °C im Spektrofluorometer untersucht (Abbildung 12).

α_1/β_1 Enzymisoform

Nach Koexpression carboxyterminal fluoreszenzmarkierter α_1 - und β_1 -Untereinheiten (CC) konnte eine FRET-Effizienz von 14,5 % ermittelt werden. Die aminoterminal fluoreszenzmarkierten α_1 - und β_1 - Untereinheiten (NN) zeigten eine FRET-Effizienz von 16,4 %. Die Kombination aus carboxyterminal markierter α_1 -Untereinheit und aminoterminal markierter β_1 -Untereinheit (CN) zeigte eine FRET-Effizienz von 11 %. Die Kombination aus aminoterminal markierter α_1 -Untereinheit und carboxyterminal β_1 -Untereinheit (NC) zeigte eine FRET-Effizienz von 7,6 %. Die Kombinationen aus aminoterminal und carboxyterminal fluoreszenzmarkierten Untereinheiten (CN, NC) zeigten eine signifikant geringe FRET-Effizienz als die Enzymvarianten bei dem beide Dimerisierungspartner carboxyterminal (CC) oder aminoterminal (NN) markiert waren.

α_2/β_1 Enzymisoform

Die carboxyterminal fluoreszenzmarkierten α_2 - und β_1 -Untereinheiten (CC) zeigten eine FRET-Effizienz von 20,4 %. Nach Koexpression aminoterminal fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Untereinheiten (NN) konnte eine FRET-Effizienz von 11,3 % ermittelt werden. Die Kombination aus carboxyterminal markierter α_2 -Untereinheit und aminoterminal markierter β_1 -Untereinheit (CN) ergab eine FRET-Effizienz von 17,4 %. Die Kombination aus aminoterminal markierter α_2 -Untereinheit und carboxyterminal β_1 -Untereinheit (NC) ergab eine FRET-Effizienz von 10,1 %.

Bei beiden Enzymisoformen konnte ein Energietransfer zwischen den fluoreszierenden Proteinen an den Enzymuntereinheiten festgestellt werden. Das bedeutet, dass sich die Abstände zwischen den fluoreszierenden Proteinen in einem Bereich unter 80 Å befinden. Bei beiden Enzymisoformen konnte eine hohe FRET-Effizienz zwischen den fluoreszierenden Proteinen am Carboxyterminus (CC) der Untereinheiten gemessen werden. Da die carboxyterminalen Bereiche der Untereinheiten die katalytische Domäne des Enzyms bilden, ist die räumliche Nähe der an ihnen fusionierten fluoreszierenden Proteine nachvollziehbar. Bei der α_1 -Isoform war die höchste FRET-Effizienz zwischen den fluoreszierenden Proteinen

am Aminoterminus (NN) zu messen. Auch bei der α_2 -Isoform trat FRET zwischen den fluoreszierenden Proteinen am Aminoterminus (NN) auf, doch die FRET-Effizienz war signifikant niedriger als zwischen den fluoreszierenden Proteinen am Carboxyterminus (CC). Überraschenderweise trat FRET auch bei den Kombinationen aus aminoterminal und carboxyterminal (CN, NC) markierten Untereinheiten auf.

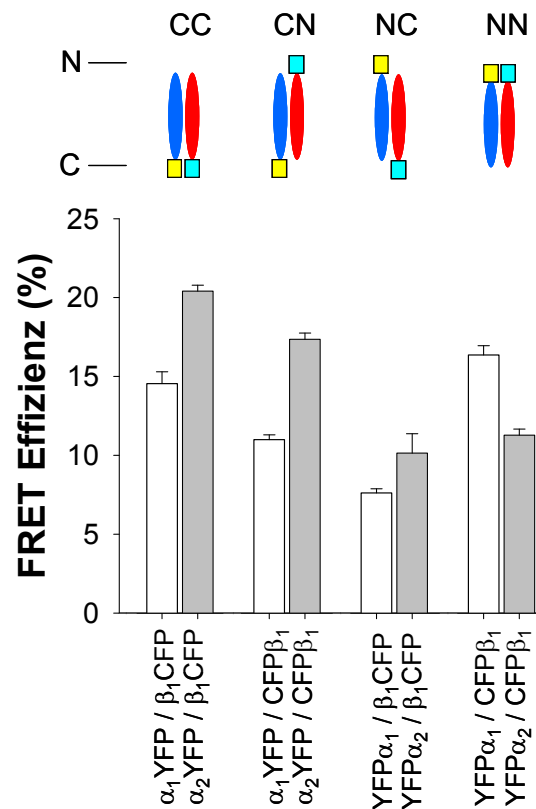


Abbildung 12: FRET-Effizienzen fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Varianten

FRET-Effizienzen fluoreszenzmarkierter α_1 Enzymisformen (weiße Säulen) und α_2 Enzymisformen (graue Säulen) wurden in cytosolischen Fraktionen von Sf9 Zellen bei 37°C gemessen. Die Abbildungen oberhalb des Diagrammes zeigen die Kombinationen der fluoreszenzmarkierten Untereinheiten (blau, α -Untereinheit; rot, β_1 -Untereinheit). Alle Werte repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen.

Diese FRET-Effizienzen waren zwar signifikant niedriger, deuten aber darauf hin, dass die aminoterminalen und carboxyterminalen Domänen des Enzyms in ausreichender Nähe für das Auftreten von Energietransfer zwischen den fluoreszierenden Proteinen sind. Diese Ergebnisse sprechen für einen Aufbau des Enzyms, bei dem die aminoterminalen regulatorischen Domänen in räumlicher Nähe zur carboxyterminalen katalytischen Domäne sind. Bei beiden Enzymisformen ist dabei der Aminoterminus der β_1 -Untereinheit näher an der katalytischen Domäne (CN) als der Aminoterminus der α -Untereinheit (NC).

4.3 Fusion der Guanylyl-Cyclase Untereinheiten mittels eines fluoreszierenden Proteins

Die Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten mittels der FRET-Methode zeigten, dass nicht nur die carboxyterminalen (CC) und aminoterminalen (NN) Enden der Untereinheiten in räumlicher Nähe sind, sondern auch der jeweilige Aminoterminus der einen Untereinheit mit dem Carboxyterminus des Dimerisierungspartners (CN, NC). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde überprüft, ob man die beiden Untereinheiten der Guanylyl-Cyclase fusionieren kann, ohne dadurch die Topologie des Enzymkomplexes signifikant zu verändern. Zwischen den fluoreszierenden Proteinen am Carboxyterminus der α -Untereinheit und dem Aminoterminus der β_1 -Untereinheit (CN) war signifikant höheres FRET aufgetreten als zwischen dem Aminoterminus der α -Untereinheit und dem Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit (NC) (siehe Abbildung 12). Vorangegangene Experimente zeigten jedoch, dass eine Fusion am Aminoterminus der β_1 -Untereinheit zu einem Enzymkomplex führt, der durch NO nicht mehr stimulierbar war (siehe Abbildung 11). Deshalb würde eine Fusion des Carboxyterminus der α -Untereinheit an den Aminoterminus der β_1 -Untereinheit wahrscheinlich maximal ein basal aktives Enzym hervorbringen. Aus diesem Grund erschien es erfolgversprechender den Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit mit dem Aminoterminus der α -Untereinheit zu fusionieren. Dieses Fusionskonstrukt würde aus einer β_1 -Untereinheit, gefolgt von einem fluoreszierenden Protein und der α -Untereinheit bestehen. Ein solches Konstrukt wurde auf molekularbiologischer Ebene generiert, indem die cDNA's kodierend für die β_1 -Untereinheit, YFP und die α -Untereinheit ohne Trennung durch ein Stop-Codon in einem offenen Leserahmen gebracht wurden (5'- β_1 YFP α -3'). Zusätzlich zu diesem Konstrukt wurde noch ein weiteres Fusionskonstrukt mit einem zusätzlichen CFP am Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit generiert (5'- β_1 YFP α CFP-3').

4.3.1 Expression der Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine im Sf9/Baculovirus System

Für die rekombinante Expression der Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine wurden die Konstrukte durch homologe Rekombination in Baculoviren gebracht. Die Expression der fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine im Sf9/Baculovirus System wurde nach elektrophoretischer Auftrennung mit spezifischen Antikörpern gegen die Guanylyl-Cyclase Untereinheiten und die fluoreszierenden Proteine überprüft (Abbildung 13). Mithilfe der spezifischen Antikörper konnten für die Fusionsproteine Signale zwischen 150 kDa und 200 kDa detektiert werden. Diese Größen der Proteine stimmen überein mit dem errechneten Molekulargewicht der Fusionsproteine.

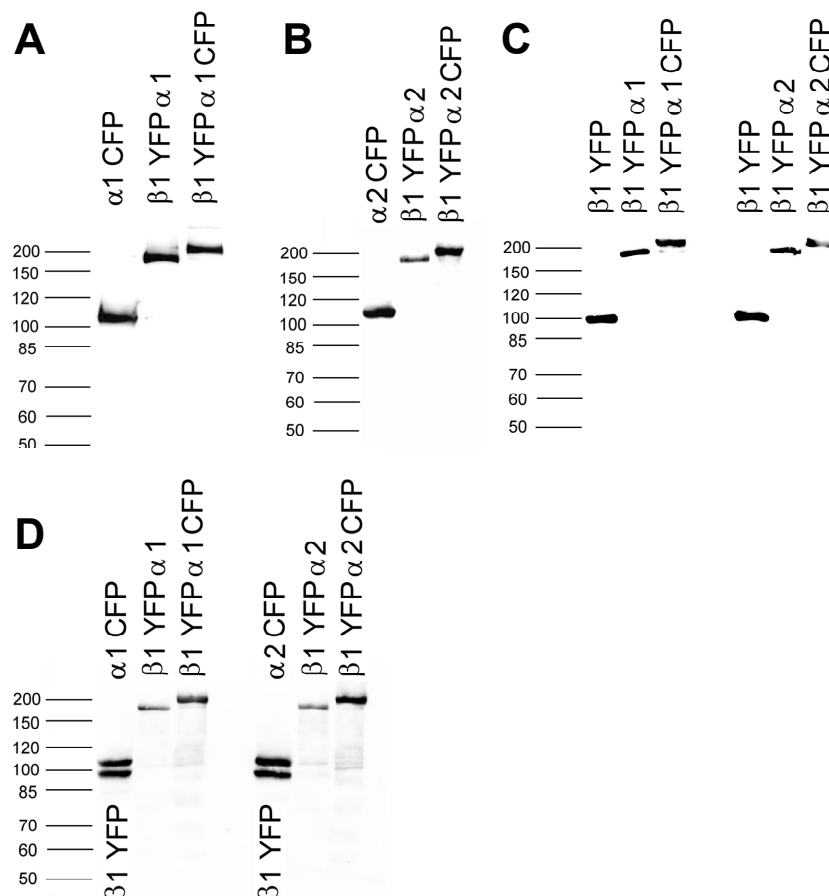


Abbildung 13: Expression fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine

Fluoreszenzmarkierte Fusionsproteine wurden nach Expression im Sf9/Baculovirus System im Cytosol von Sf9 Zellen nachgewiesen. 30 µg Protein wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen die α_1 -Untereinheit (A), α_2 -Untereinheit (B), β_1 -Untereinheit (C) und gegen GFP (D). Die fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine konnten bei dem erwarteten Molekulargewicht detektiert werden (β_1 YFP α_1 176 kDa, β_1 YFP α_2 185 kDa, β_1 YFP α_1 CFP 205 kDa, β_1 YFP α_2 CFP 211 kDa).

4.3.2 Messung der Enzymaktivität der Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine

Nachdem die Expression der fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine bestätigt werden konnte, wurde geprüft ob trotz der Fusion der Guanylyl-Cyclase Untereinheiten mittels eines fluoreszierenden Proteins als verbindendes Element, ein funktioneller Enzymkomplex gebildet wird. Die Bildung eines funktionellen Enzyms wurde durch Messung der spezifischen Guanylyl-Cyclase Enzymaktivität untersucht. Die spezifische Enzymaktivität der Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine wurde unter basalen, NO stimulierten (100 μ M DEA/NO) und NO/YC-1 stimulierten (100 μ M DEA/NO, 10 μ M YC-1) Bedingungen bestimmt (Abbildung 14). Es konnte gezeigt werden, dass die einfach- sowie doppelt fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine basal, NO-stimulierte und NO/YC-1 stimulierte Enzymaktivität aufwiesen. Dieses Ergebnis konnte mit den α_1 -Isoformen und α_2 -Isoformen der Fusionsproteine nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14).

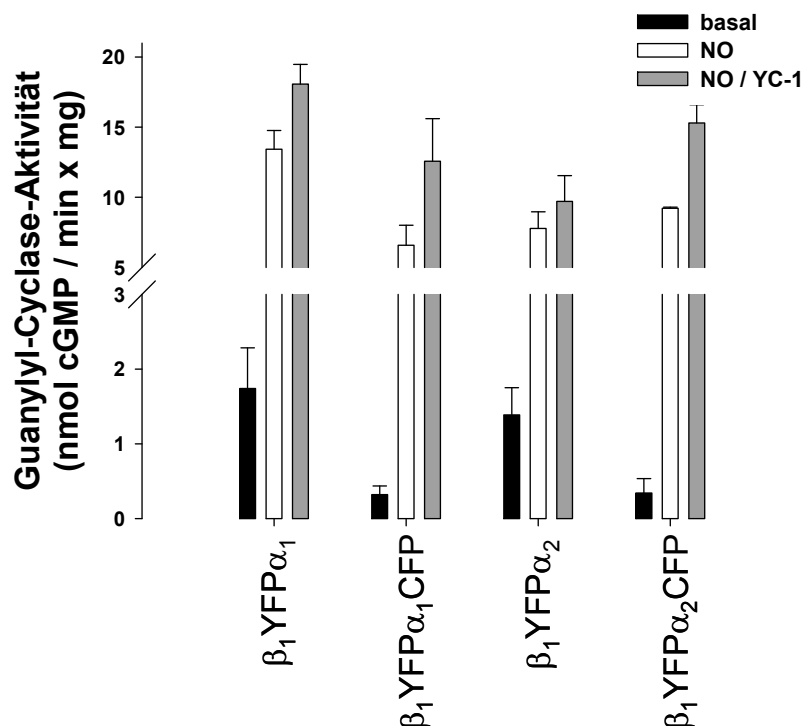


Abbildung 14: Messung der spezifischen Enzymaktivität fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine

Enzymaktivitäten einfach- und doppelt fluoreszenzmarkierter Fusionsproteine wurde in Gegenwart von Mg^{2+} unter basalen (schwarze Säulen), NO-stimulierten (100 μ M DEA/NO weiße Säulen) und unter NO/YC-1 stimulierten (100 μ M DEA/NO und 10 μ M YC-1, graue Säulen) Bedingungen bestimmt. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Bestimmung der Enzymaktivität bestätigte die Expression eines funktionellen Enzymkomplexes nach Fusion der Guanylyl-Cyclase Untereinheiten zwischen dem β_1 Carboxyterminus und dem α Aminoterminal mittels eines fluoreszierenden Proteins.

4.3.3 Anreinigung des β_1 YFP α_2 Guanylyl-Cyclase Fusionsproteins

Zur weiteren Untersuchung der fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Fusionskonstrukte, wurde ein β_1 YFP α_2 Konstrukt mit carboxyterminalen *Strep*-Tag generiert und mittels rekombinanter Baculoviren in Sf9-Zellen exprimiert. Durch Affinitätschromatographie wurde das Fusionsprotein aus cytosolischer Fraktion von Sf9-Zellen angereinigt. Nach elektrophoretischer Auftrennung konnte in der angereinigten Fraktion mittels Coomassie blue Färbung nur eine Proteinbande zwischen den Markerbanden für 150 kDa und 200 kDa detektiert werden (Abbildung 15). Das berechnete Molekulargewicht für das *Strep*-markierte β_1 YFP α_2 Fusionsprotein ist 186 kDa. Dementsprechend handelt es sich bei dem aus Sf9-Zell Cytosol angereinigten Protein um das erwartete Fusionsprotein (siehe Abbildung 15).

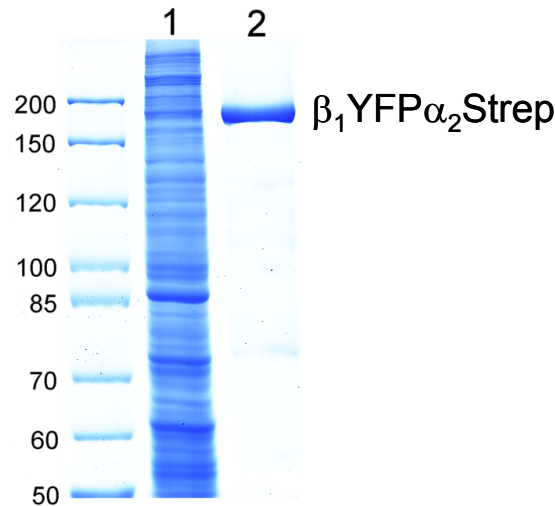


Abbildung 15: Expression und Anreinigung des β_1 YFP α_2 Strep Fusionsproteins

Das carboxyterminal *Strep*-markierte β_1 YFP α_2 Fusionsprotein wurde in Sf9-Zellen exprimiert und aus cytosolischer Fraktion mittels *Strep*-Tag Chromatographie angereinigt. Nach elektrophoretischer Trennung wurde das Fusionsprotein bei dem erwarteten Molekulargewicht (186 kDa) mittels Coomassie blue Färbung detektiert. 1- 30 μ g Protein aus cytosolischer Fraktion aus Sf9-Zellen. 2- Mittels *Strep*-Tag Chromatographie angereinigte Fraktion (1 μ g Protein).

Die Messung der Enzymaktivität des angereinigten β_1 YFP α_2 Strep Fusionsproteins belegte, dass der Enzymkomplex basale und NO-stimulierte Enzymaktivität aufweist.

Darüber hinaus wurde das Enzym durch den hämunabhängigen Guanylyl-Cyclase Aktivator Cinaciguat aktiviert (Abbildung 16).

Die Untersuchungen zeigen, dass das Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine stabile Proteine sind, die nach rekombinanter Expression in Sf9-Zellen einen funktionellen Enzymkomplex bilden und sich durch Affinitätschromatographie anreinigen lassen.

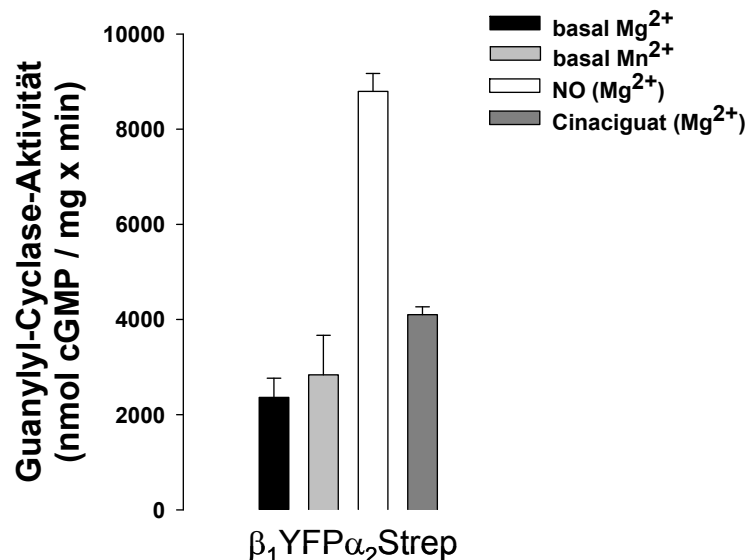


Abbildung 16: Messung der Enzymaktivität des angereinigten $\beta_1YFP\alpha_2Strep$ Fusionsproteins

Die spezifische Guanylyl-Cyclase-Aktivität wurde unter basalen Bedingungen in Gegenwart von Mg^{2+} (schwarze Säule) und Mn^{2+} (graue Säule) bestimmt. Außerdem wurde die Aktivität in Gegenwart von Mg^{2+} unter NO-stimulierten (100 μM DEA/NO, weiße Säule) Bedingungen und in Gegenwart von 10 μM Cinaciguat (dunkel graue Säule) bestimmt. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen.

4.3.4 FRET-Untersuchung an Guanylyl-Cyclase Fusionsproteinen

Die vorangegangenen Versuche zeigten, dass die fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine erfolgreich in Sf9-Zellen exprimiert werden können und funktionelle Enzymkomplexe bilden. Im Folgenden wurde überprüft, ob die fluoreszierenden Proteine der Fusionsproteine ihre spektralen Eigenschaften beibehalten und somit für FRET-Untersuchungen oder zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation *in vivo* geeignet sind. Insbesondere bei dem YFP, welches die Guanylyl-Cyclase Untereinheiten verbindet, besteht die Möglichkeit, dass es durch eine Änderung der Konformation des fluoreszierenden Proteins zu veränderten spektralen Eigenschaften kommt. Für die Untersuchungen wurden die fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine in Sf9-Zellen exprimiert und in cytosolischer Fraktion im Spektrofluorometer vermessen. Zum Vergleich wurden

Emissionsspektren von reinem CFP und YFP nach Anregung bei 436 nm (CFP) und 515 nm (YFP) aufgenommen (Abbildung 17).

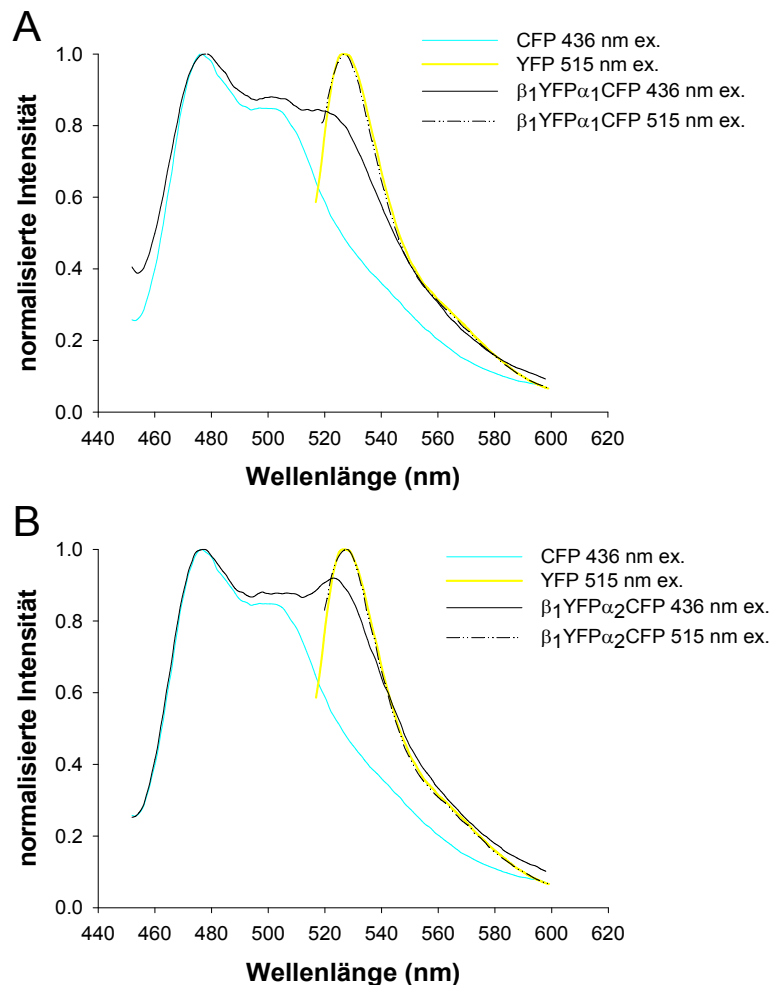


Abbildung 17: Spektrale Eigenschaften der fluoreszierenden Proteine der fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine

Die Abbildungen zeigen die Emissionsspektren der fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine nach Anregung bei 436 nm (schwarze durchgezogene Linie) und 515 nm (schwarze gestrichelte Linie) im Vergleich zu den unfusionierten fluoreszierenden Proteinen CFP (cyane Linie) und YFP (gelbe Linie). Emissionsspektren von β_1 YFP α_1 CFP (**A**) und β_1 YFP α_2 CFP (**B**) wurden nach rekombinanter Expression in cytosolischer Fraktion von Sf9-Zellen bei 37 °C im Spektrofluorometer ermittelt.

Die spektralen Untersuchungen zeigten, dass die Fluoreszenz des YFP zwischen den Untereinheiten keine Veränderung zur Fluoreszenz von unfusioniertem YFP aufweist. Nach Anregung bei 436 nm zeigten die Fusionsproteine ein verändertes Spektrum im Vergleich zu reinem CFP. Neben dem Emissionsmaximum bei 478 nm war bei β_1 YFP α_1 CFP eine Schulter und bei β_1 YFP α_2 CFP ein weiteres Maximum bei ca. 525 nm zu beobachten. Die Veränderung ist jedoch nicht auf eine veränderte Fluoreszenz des CFP, sondern auf das Auftreten von FRET zwischen den fluoreszierenden Proteinen zurückzuführen. Die spektralen Eigenschaften des YFP blieben auch bei den einfach-fluoreszenzmarkierten Fusionsproteinen (β_1 YFP α_1 ,

β_1 YFP α_2) erhalten (Ergebnisse nicht gezeigt). Die doppelt-fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine (β_1 YFP α_1 CFP, β_1 YFP α_2 CFP) enthalten zusätzlich zu dem YFP zwischen den Guanylyl-Cyclase Untereinheiten ein CFP am carboxyterminalen Ende der Proteinkette. Diese Konstellation der fluoreszierenden Proteine entspricht der des carboxyterminal fluoreszenzmarkierten Heterodimers (CC) (Abbildung 18). Auf Basis der Enzymaktivitätsuntersuchungen bilden diese doppelt-fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine einen funktionalen Enzymkomplex aus. Mithilfe der doppelt-fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine gab es die Möglichkeit intramolekulares FRET zwischen den fluoreszierenden innerhalb einer Proteinkette zu messen. Dazu wurden die Fusionsproteine in Sf9-Zellen überexprimiert und anschließend bei 37 °C im Spektrofluorometer untersucht (siehe Abbildung 18).

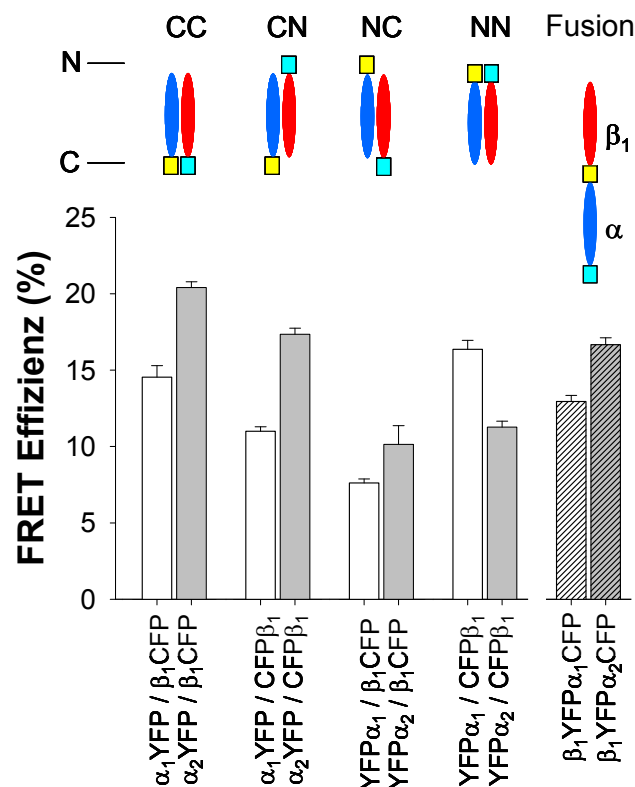


Abbildung 18: FRET-Effizienzen der fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine im Vergleich zu den fluoreszenzmarkierten heterodimeren Enzymvarianten (Abbildung 13)

FRET-Effizienzen wurden in cytosolischer Fraktion von Sf9-Zellen bei 37°C gemessen. Zwischen den fluoreszierenden Proteinen in den doppelt-fluoreszenzmarkierten Fusionsproteinen tritt FRET auf. Die Fusionsproteine β_1 YFP α_1 CFP (gestreifte weiße Säule) und β_1 YFP α_2 CFP (gestreifte graue Säule) zeigen FRET-Effizienzen von 13 % bzw. 16 %. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen.

Die FRET Messungen zeigten, dass spezifisches FRET zwischen den fluoreszierenden Proteinen innerhalb der Fusionsproteine $\beta_1\text{YFP}\alpha_1\text{CFP}$ und $\beta_1\text{YFP}\alpha_2\text{CFP}$ auftritt. Die α_1 -Isoform des doppelt-fluoreszenzmarkierten Fusionsproteins zeigte eine FRET-Effizienz von 13 %. Die α_2 -Isoform des doppelt fluoreszenzmarkierten Fusionsproteins zeigte eine FRET-Effizienz von 16 % (siehe Abbildung 18). Die ermittelten FRET-Effizienzen der Fusionsproteine waren damit etwas geringer als bei dem jeweiligen carboxyterminal fluoreszenzmarkierten Heterodimer (CC). Insgesamt sind die ermittelten Werte für das *intramolekulare* FRET der Fusionsproteine jedoch ähnlich zu dem *intermolekularen* FRET der Heterodimere. Aus den gemessenen FRET-Effizienzen der fluoreszenzmarkierten Heterodimere und Fusionsproteine konnten die Entfernungen zwischen den fluoreszierenden Proteinen ermittelt werden (Abbildung 19). Die Entfernung zwischen den fluoreszierenden Proteinen am Carboxyterminus (CC) der Untereinheiten ist demnach 65,9 Å für die α_1 -Isoform und 61,5 Å für die α_2 -Isoform. Das entspricht einem Abstand, wie er durch eine helikale Proteinstruktur von 18 Aminosäuren zwischen zwei fluoreszierenden Proteinen verursacht wird [182]. Zwischen den fluoreszierenden Proteinen am Carboxyterminus der α -Untereinheiten und am Aminoterminus der β_1 -Untereinheit (CN) wurde eine Entfernung von 69,4 Å für die α_1 -Isoform und 63,6 Å für die α_2 -Isoform gemessen. Das entspricht der Entfernung, die eine helikale Proteinstruktur von 28 Aminosäuren zwischen zwei fluoreszierenden Proteinen einnimmt [182]. Die Entfernung zwischen den fluoreszierenden Proteinen am Aminoterminus der α -Untereinheit und Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit (NC) beträgt 74,3 Å für die α_1 -Isoform und 70,8 Å für die α_2 -Isoform. Dieser Abstand würde von einer helikalen Proteinstruktur von 48 Aminosäuren hervorgerufen werden [182]. Zwischen den fluoreszierenden Proteinen am Aminoterminus der beiden Untereinheiten (NN) konnte eine Entfernung von 64,3 Å für α_1 -Isoform und 69,1 Å für die α_2 -Isoform ermittelt werden. Die Entfernung zwischen den fluoreszierenden Proteinen innerhalb der Fusionsproteine beträgt 67,3 Å für die α_1 -Isoform und 64,1 Å für die α_2 -Isoform. Damit ist die ermittelte Entfernung innerhalb der Fusionsproteine geringer als bei den carboxyterminal markierten Heterodimeren. Dies kann durch eine leichte Veränderung der Position oder der Orientierung der fluoreszierenden Proteine zustande kommen. Zusammen mit der Enzymaktivitätsbestimmung in Anwesenheit von NO und NO-unabhängigen Guanylyl-Cyclase-Modulatoren zeigen

diese Ergebnisse, dass sich die spezifische Konformation des Enzyms durch die Fusion der Untereinheiten nicht wesentlich verändert.

		Effizienz in %	Entfernung in Å
α 1YFP/ β 1CFP	CC	$14,5 \pm 0,8$	$65,9 \pm 0,7$
α 2YFP/ β 1CFP	CC	$20,4 \pm 0,4$	$61,5 \pm 0,2$
YFP-18aa-CFP *		20,0	61,7
α 1YFP/CFP β 1	CN	$11,0 \pm 0,3$	$69,4 \pm 0,4$
α 2YFP/CFP β 1	CN	$17,4 \pm 0,4$	$63,6 \pm 0,3$
YFP-28aa-CFP *		13,1	67,1
YFP α 1/ β 1CFP	NC	$7,6 \pm 0,3$	$74,3 \pm 0,5$
YFP α 2/ β 1CFP	NC	$10,1 \pm 1,2$	$70,8 \pm 1,8$
YFP-48aa-CFP *		10,5	70,0
YFP α 1/CFP β 1	NN	$16,4 \pm 0,6$	$64,3 \pm 0,5$
YFP α 2/CFP β 1	NN	$11,3 \pm 0,4$	$69,1 \pm 0,5$
β 1YFP α 1CFP	Fusion	$13,0 \pm 0,4$	$67,3 \pm 0,4$
β 1YFP α 2CFP	Fusion	$16,7 \pm 0,5$	$64,1 \pm 0,3$
CFP/YFP		$0,0 \pm 0,2$	n/a

Abbildung 19: FRET-Effizienzen fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Untereinheiten

Ermittelte FRET-Effizienzen und daraus errechnete Abstände zwischen den fluoreszierenden Proteinen (in Å) von fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte (\pm S.E.M.) aus drei unabhängigen Versuchen.

Auch nach intensiver Untersuchung der fluoreszenzmarkierten heterodimeren Enzymvarianten und der doppelt fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine mit NO und Modulatoren der Guanylyl-Cyclase-Aktivität, konnte keine FRET-Änderung beobachtet werden. Gleichzeitig zeigten wir am Beispiel des cGMP Sensors YFP-GAFA-CFP, dass der experimentelle Aufbau geeignet war, FRET-Veränderungen zu detektieren.

4.5 *In vivo* Untersuchung fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Enzymvarianten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine der Guanylyl-Cyclase funktionsfähige Enzymkomplexe bilden, wobei auch die spektralen Eigenschaften der fluoreszierenden Proteine erhalten bleiben, wurde untersucht ob sich die Fusionsproteine für die Lokalisation des heterodimeren und damit aktiven Enzyms *in vivo* eignen. In weiterführenden Experimenten sollte geprüft

werden, ob mithilfe der Fusionsproteine isoformspezifische Unterschiede in der subzellulären Lokalisation zu beobachten sind.

4.5.1 Expression fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine in HEK 293-Zellen

Für *in vivo* Untersuchungen der fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Enzymvarianten wurden HEK 293-Zellen mit den entsprechenden cDNAs transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie bei 37 °C und 5 % CO₂ untersucht. Zellen, die mit der cDNA kodierend für das β_1 YFP α_1 Fusionsprotein transfiziert wurden, zeigten eine cytosolische Lokalisation des Enzymkomplexes (Abbildung 20).

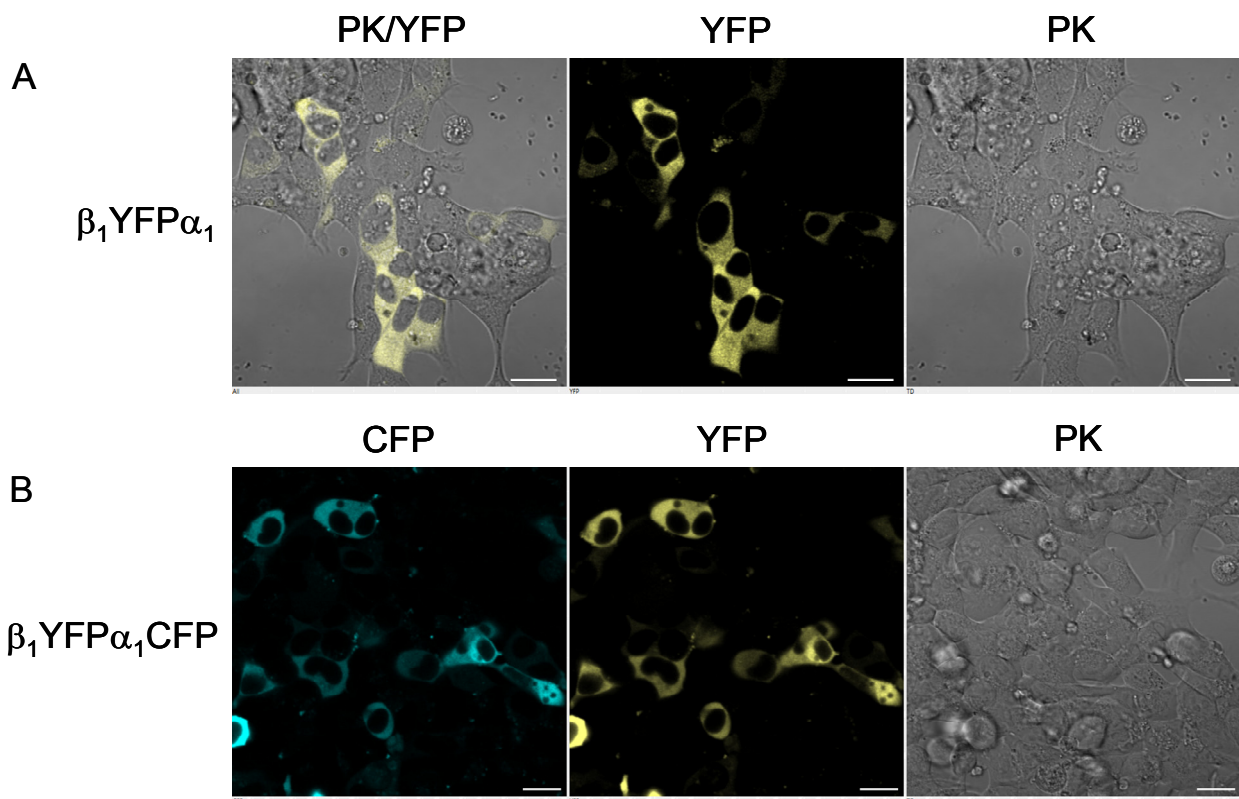


Abbildung 20: Expression der α_1 -Isoform fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine in HEK 293-Zellen

In transient transfizierten HEK 293-Zellen zeigt die α_1 -Isoform des einfach- (β_1 YFP α_1) (A) und doppelt (β_1 YFP α_1 CFP) (B) fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Fusionsproteins ein cytosolisches Expressionsmuster. Die Länge der weißen Balken entspricht 20 μ m. PK, Phasenkontrast; CFP, CFP-Kanal; YFP, YFP-Kanal

Auch Zellen, die mit der cDNA kodierend für das doppelt fluoreszenzmarkierte Fusionsprotein ($\beta_1\text{YFP}\alpha_1\text{CFP}$) transfiziert wurden, zeigten im CFP und YFP Kanal ein cytosolisches Expressionsmuster. Darüber hinaus war bei beiden Proteinen keine Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns detektierbar. Die Untersuchungen in lebenden Zellen belegten, dass die fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine $\beta_1\text{YFP}\alpha_1$ und $\beta_1\text{YFP}\alpha_1\text{CFP}$, wie für die lösliche Guanylyl-Cyclase erwartet, cytosolisch vorliegen.

Frühere Untersuchungen zeigten, dass die α_2 -Untereinheit eine carboxyterminale PDZ Erkennungssequenz aufweist, über die sie an PDZ Domänen des *post synaptic density proteins 95* (PSD95) bindet [53]. Benannt sind diese Domänen nach den ersten Proteinen, in denen sie identifiziert wurden (*post synaptic density protein*, PSD 95/SAP 90; *disc large*, DLG; *zona occludens*, ZO) [183]. Darüber hinaus wurde die α_2 -Untereinheit vermehrt in der Membranfraktion von Homogenaten aus Rattenhirn nachgewiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine durch PSD95 vermittelte membranassoziierte Lokalisation der α_2 -Untereinheit vermutet. Die Untersuchungen in lebenden HEK 293-Zellen zeigten, dass im Gegensatz zur α_1 -Isoform die einfach-fluoreszenzmarkierte α_2 -Isoform des Fusionsproteins ($\beta_1\text{YFP}\alpha_2$) eine membranäre Lokalisation in HEK 293-Zellen aufweist (Abbildung 21). Dabei war die Lokalisation an der Zellmembran an Zell-Zell Kontakten zu beobachten, während an Membranabschnitten ohne eine direkte Nachbarzelle keine membranäre Lokalisation nachweisbar war (siehe Abbildung 21 A). Beim α_2 Fusionsprotein mit einem carboxyterminalen CFP ($\beta_1\text{YFP}\alpha_2\text{CFP}$) ist die carboxyterminale PDZ-Erkennungssequenz der α_2 -Untereinheit durch das CFP ausgetauscht. Nach transienter Transfektion in HEK 293-Zellen zeigte das doppelt-fluoreszenzmarkierte Fusionsprotein mit carboxyterminalem CFP ($\beta_1\text{YFP}\alpha_2\text{CFP}$) ein cytosolisches Expressionsmuster identisch mit dem der α_1 -Isoform der fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine (siehe Abbildung 21 B). In Abbildung 20 B ist zu sehen, dass beim $\beta_1\text{YFP}\alpha_2\text{CFP}$ Fusionsprotein keine membranäre Lokalisation vorliegt, obwohl im abgebildeten Bereich die Zellen sehr dicht sind und dadurch viele Zell-Zell Kontakte vorhanden sind.

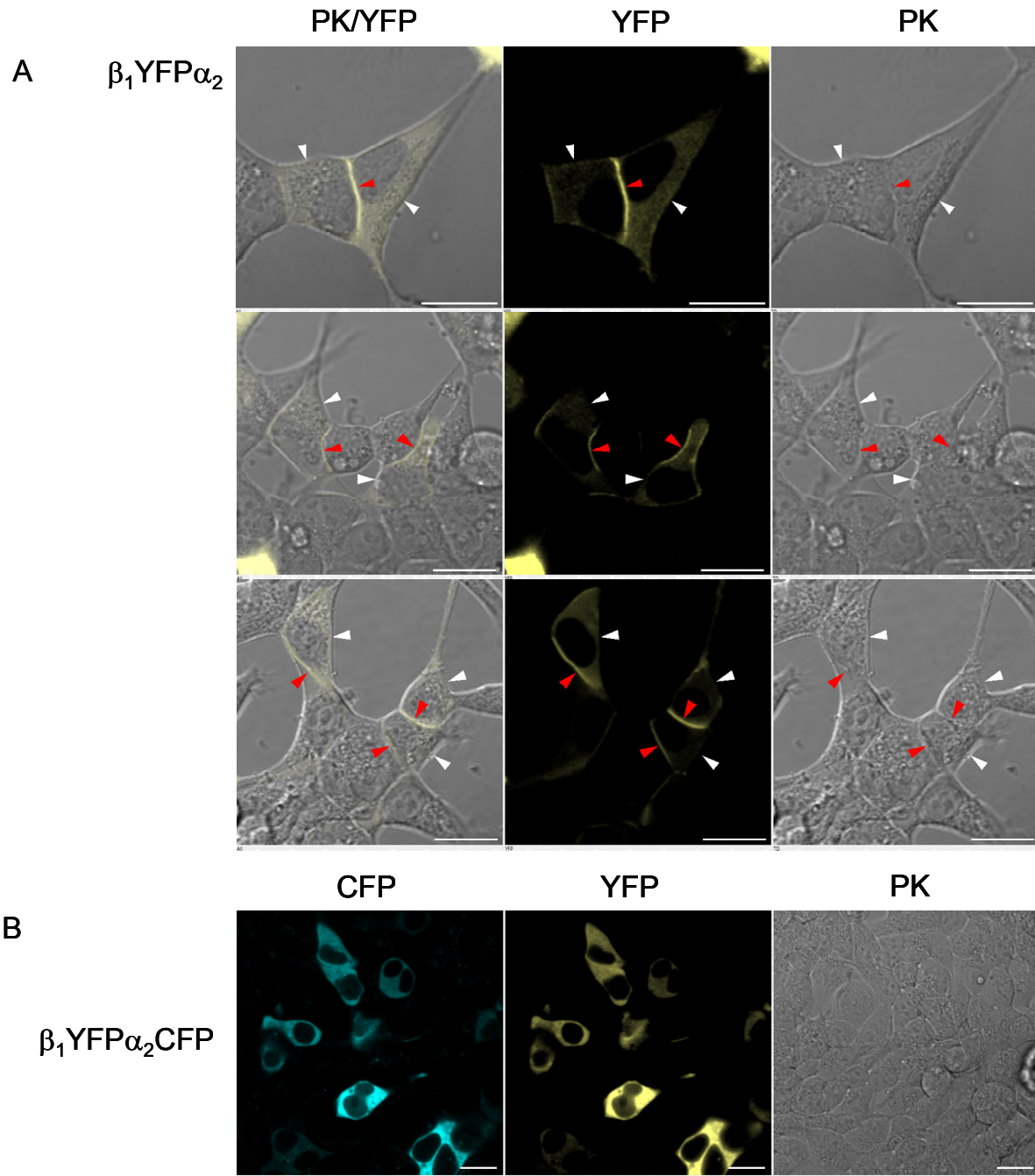


Abbildung 21: Expression der α_2 -Isoform fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine in transient transfizierten HEK 293-Zellen

A- In transient transfizierten HEK 293-Zellen zeigt die α_2 -Isoform ($\beta_1\text{YFP}\alpha_2$) des Guanylyl-Cyclase Fusionsproteins ein membranäres Expressionsmuster. Speziell an Zell-Zell Kontakten (rote Pfeile) ist diese Lokalisation zu erkennen, während an den Seiten der Zelle an denen sich keine benachbarte Zelle befindet (weiße Pfeile) keine Fluoreszenz zu erkennen ist. **B-** Das $\beta_1\text{YFP}\alpha_2\text{CFP}$ Fusionsprotein zeigt dagegen ein rein cytosolisches Expressionsmuster. Die Länge der weißen Balken entspricht 20 μm . PK, Phasenkontrast; CFP, CFP-Kanal; YFP, YFP-Kanal

Zur weiteren Untersuchung der Lokalisation der beiden Enzymisofomen in der Zelle wurden die fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine in HEK 293-Zellen koexprimiert. Durch die Generierung einer photostabilen und stark fluoreszierenden Variante des blau fluoreszierenden Proteins (Azurite) war eine eindeutige Trennung der

Fluoreszenzen und damit der Enzymisoformen möglich. Die YFP markierte α_1 -Isoform der Guanylyl-Cyclase zeigte auch nach Koexpression mit der α_2 -Isoform ein cytosolisches Expressionsmuster. Im Gegensatz dazu ist die Azurite-markierte α_2 -Isoform spezifisch an Zell-Zell Kontakten lokalisiert (Abbildung 22).

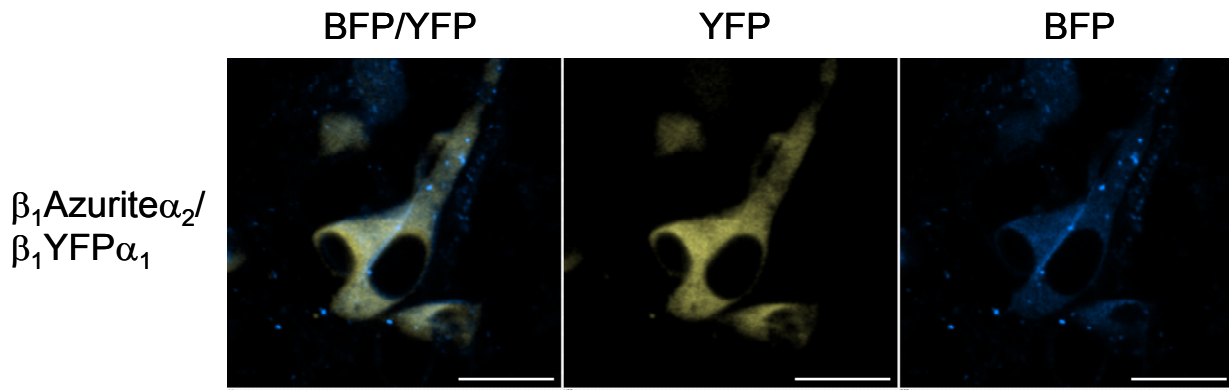


Abbildung 22: Koexpression von β_1 YFP α_1 und β_1 Azurite α_2 in HEK 293-Zellen

Die Guanylyl-Cyclase zeigt isoformspezifische Unterschiede in der Lokalisation in transient transfizierten HEK 293-Zellen. Die Länge der weißen Balken entspricht 20 µm. BFP, BFP-Kanal; YFP, YFP-Kanal

Die Dynamik der Lokalisation der α_2 -Isoform an Zell-Zell Kontakten wurde in transient transfizierten HEK 293-Zellen unter optimalen Kulturbedingungen (5 % CO₂, 37 °C) über mehrere Stunden hinweg untersucht (Abbildung 23). Die Zeitserien zeigten, dass die fluoreszenzmarkierte α_2 Enzymisoform sehr schnell und spezifisch an Zell-Zell Verbindungen lokalisiert ist. Die in Abbildung 23 aufgenommene Zelle zeigt in dem dargestellten Zeitraum die Ausbildung und Auflösung einer Zell-Zell Interaktion. An dem Membranabschnitt, an dem sich der Kontakt ausbildet ist eine erhöhte Fluoreszenz zu sehen (20 min). Nach Auflösung des Kontaktes (60 min) ist in diesem Bereich der Membran keine Fluoreszenz mehr erkennbar.

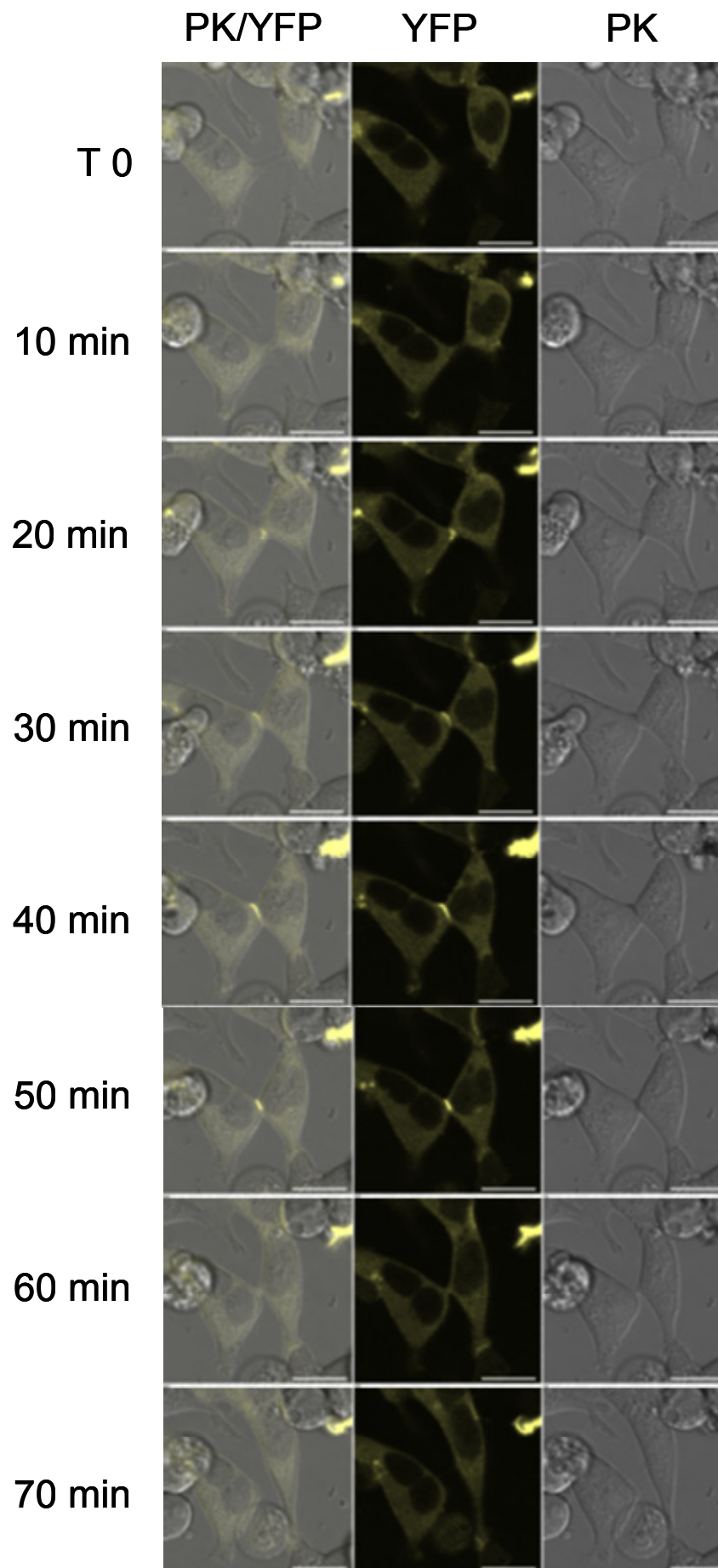


Abbildung 23: Spezifische Lokalisation des β_1 YFP α_2 Fusionsproteins an Zell-Zell Kontakten

Die transient transfizierten HEK 293-Zellen wurden unter Kulturbedingungen (5 % CO₂, 37 °C) untersucht. Die Zeitserie zeigt einen Abschnitt, in dem sich in einem Zeitraum von 70 min ein Kontakt zwischen zwei Zellen ausbildet und anschließend wieder auflöst. Das Fusionsprotein ist speziell an Membranabschnitten, an denen eine Zell-Zell Interaktion stattfindet lokalisiert. Die Länge der weißen Balken entspricht 20 μ m. PK, Phasenkontrast; YFP, YFP-Kanal

4.5.2 Untersuchung der Lokalisation der fluoreszenzmarkierten α_2 -Enzymisoform

Die vorangegangenen Untersuchungen belegten, dass die α_2 Enzymisoform der Guanylyl-Cyclase nicht allgemein assoziiert an der Zellmembran vorliegt, sondern speziell an Zell-Zell Kontakten lokalisiert ist. Zur näheren Untersuchung, ob diese Lokalisation durch andere Proteine oder durch das Enzym selbst vermittelt wird, wurden verschiedene Mutationen in das β_1 YFP α_2 Fusionsprotein eingeführt. Zur Untersuchung, ob die spezielle Lokalisation von der Aktivität des Enzymkomplexes abhängig ist, wurde ein inaktiver Enzymkomplex durch die Mutation des Aspartats 568 (D568A) innerhalb der katalytischen Domäne der α_2 -Untereinheit generiert (Nummerierung auf Basis der isolierten α_2 -Untereinheit der Ratte). Darüber hinaus wurde durch Mutation des Histidins 105 (H105A) in der H-NOX Domäne der β_1 -Untereinheit ein hämfreier und dadurch ausschließlich basal aktiver Enzymkomplex generiert. Um den Einfluss der carboxyterminalen RETSL Sequenz der α_2 -Untereinheit auf die Lokalisation des fluoreszenzmarkierten Fusionsproteins genauer zu untersuchen, wurde die letzte Aminosäure der α_2 -Untereinheit innerhalb des β_1 YFP α_2 Fusionsproteins mutiert (L730R, Nummerierung auf Basis der isolierten α_2 -Untereinheit der Ratte). Durch diese Mutation wurde die spezifische PDZ-Erkennungssequenz RETSL zu RESTR verändert. Die Expression der mutierten β_1 YFP α_2 Fusionsproteine wurde nach transienter Transfektion in HEK 293-Zellen mittels Western Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 25). Die mikroskopische Untersuchung in lebenden Zellen ließ erkennen, dass die β_1 YFP α_2 D568A und β_1 YFP α_2 H105A Mutanten weiterhin an Zell-Zell Kontakten lokalisiert waren (Abbildung 24). Die in ihrer Enzymaktivität eingeschränkten Mutanten zeigten die Lokalisation an Zell-Zell Kontakten in gleichem Ausmaß wie das unveränderte β_1 YFP α_2 Fusionsprotein. Die β_1 YFP α_2 RESTR Variante zeigte, dagegen nach transienter Transfektion in HEK 293-Zellen ein ausschließlich cytosolisches Expressionsmuster (siehe Abbildung 24).

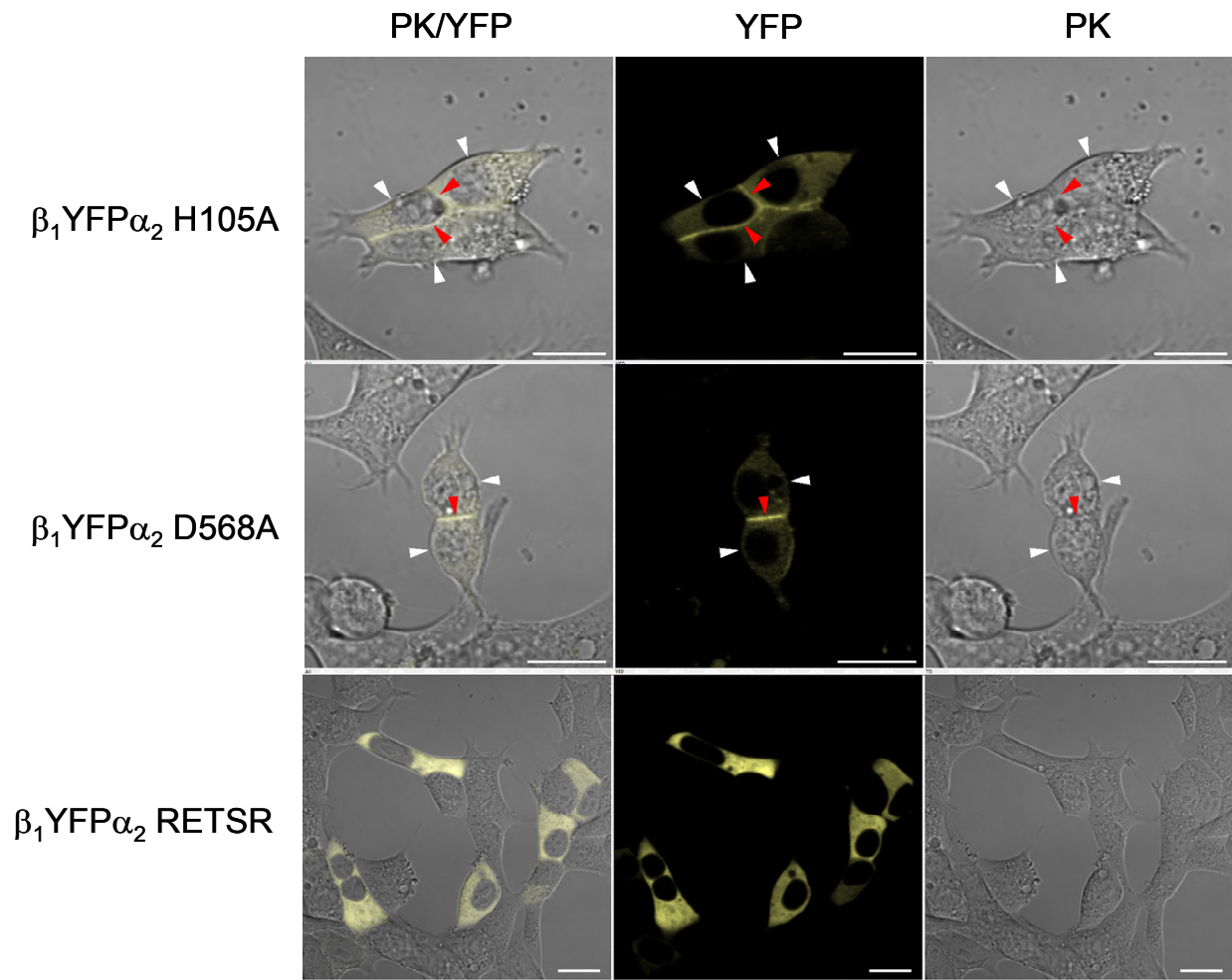


Abbildung 24: *In vivo* Lokalisation verschiedener Mutanten des β_1 YFP α_2 Fusionsproteins

Die in ihrer Enzymaktivität eingeschränkten Mutanten D568A und H105A des β_1 YFP α_2 Fusionsproteins sind an Zell-Zell Kontakten lokalisiert. Die Mutation der PDZ-Erkennungssequenz führt zu einer ausschließlich cytosolischen Lokalisation des Fusionsproteins. Die Länge der weißen Balken entspricht 20 μ m. PK, Phasenkontrast; YFP, YFP-Kanal

Die *in vivo* Untersuchungen in HEK 293-Zellen mit mutierten Varianten des β_1 YFP α_2 Fusionsproteins belegten, dass die carboxyterminale PDZ-Erkennungssequenz für die Lokalisation an Zell-Zell Kontakten verantwortlich ist. Der Austausch des Leucins durch Arginin innerhalb der RETSL Sequenz führt zu einem cytosolischen Expressionsmuster der α_2 Enzymisoform.

Zur Überprüfung der Expression der transient transfizierten cDNA wurden die Proteine aus HEK-Zell Homogenaten nach elektrischer Auftrennung mit spezifischen Antikörpern gegen die fluoreszierenden Proteine nachgewiesen.

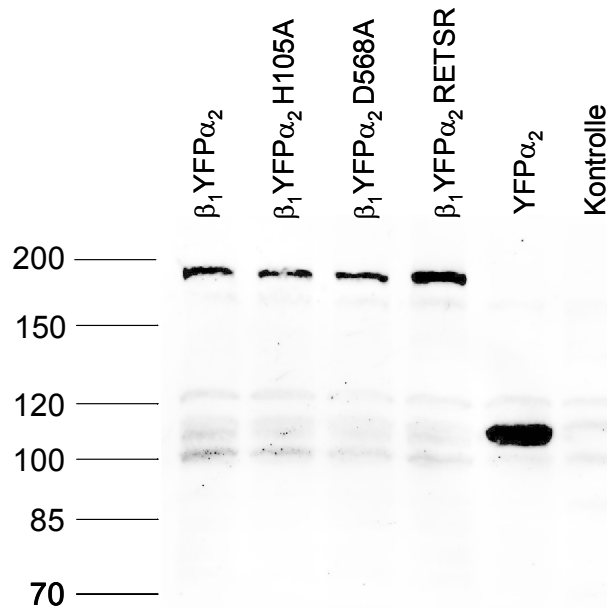


Abbildung 25: Expression des β_1 YFP α_2 Fusionsproteins und der mutierten Varianten in HEK 293-Zellen

Die β_1 YFP α_2 Fusionsproteine und mutierte Varianten wurden nach transienter Transfektion von HEK 293-Zellen in Homogenaten mittels spezifischer Antikörper gegen GFP detektiert. Für das β_1 YFP α_2 Fusionsprotein konnten Signale bei dem erwarteten Molekulargewicht (185 kDa) detektiert werden. Die carboxyterminal YFP markierte α_2 -Untereinheit konnte bei dem erwarteten Molekulargewicht (113 kDa) detektiert werden.

Für das β_1 YFP α_2 Fusionsprotein und die mutierten Varianten wurden Signale bei 180 kDa detektiert. Diese Größe stimmt überein mit dem vorhergesagten Molekulargewicht von 185 kDa für das β_1 YFP α_2 Fusionsprotein. Nach Expression von YFP α_2 konnte ein Signal zwischen 100 kDa und 120 kDa detektiert werden. Auch dieses Signal stimmt überein mit dem erwarteten Molekulargewicht von YFP α_2 von 113 kDa. Die Western-Immunoblot Analyse zeigt, dass das β_1 YFP α_2 Fusionsprotein und die mutierten Varianten des Proteins exprimiert werden.

4.5.2 *In vivo* Untersuchung möglicher Interaktionspartner der Guanylyl-Cyclase α_2 -Isoform

Die bisherigen Versuche zeigten, dass die Lokalisation des β_1 YFP α_2 Fusionsproteins durch die carboxyterminale PDZ-Erkennungssequenz der α_2 -Untereinheit vermittelt wird. Deshalb sollte untersucht werden, ob Gerüstproteine mit PDZ-Domänen potenzielle Interaktionspartner des α_2 Isoenzyms sind.

Dazu wurden die Proteine SAP90 (*synaptic associated protein*), DLG (*disc large*) und *scribble* mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert und in HEK 293-Zellen untersucht. Nach transienter Transfektion in HEK 293-Zellen zeigten SAP90 YFP und DLG YFP

ein cytosolisches Expressionsmuster (Abbildung 26). Es konnte weder eine membranäre Expression, noch spezielle Expression an Zell-Zell Kontakten beobachtet werden.

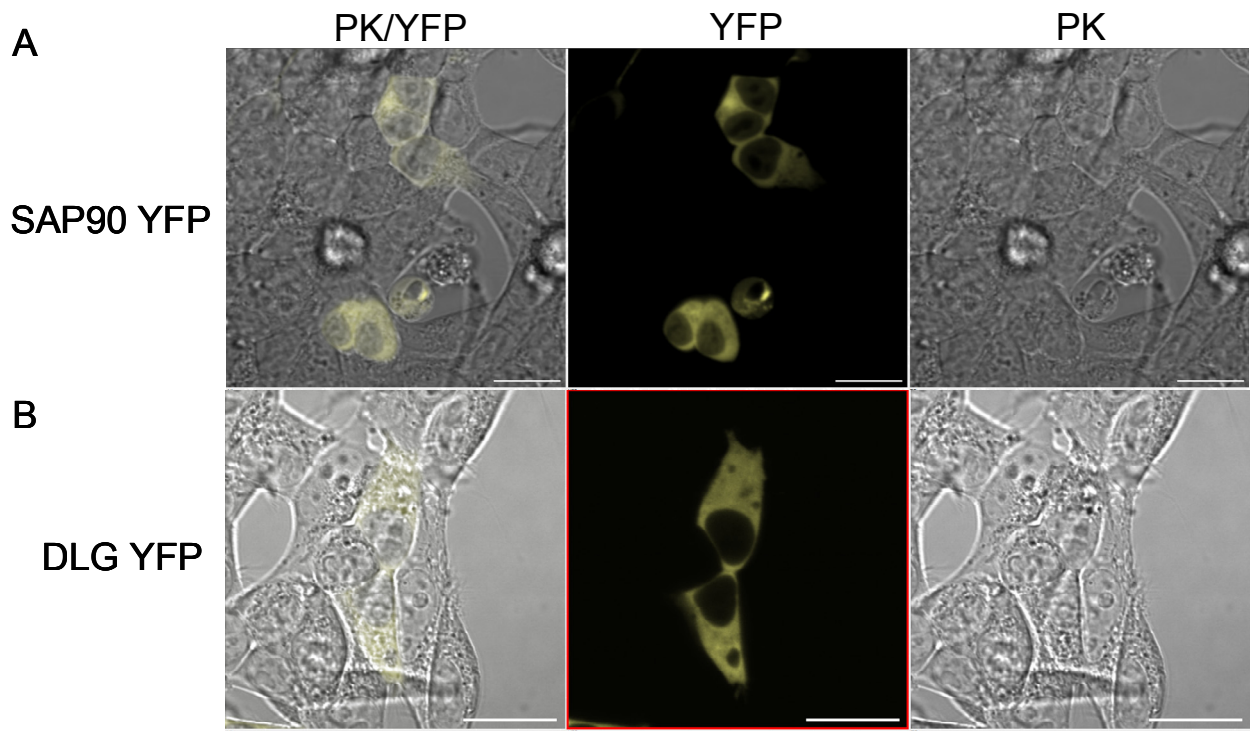


Abbildung 26: Expression von fluoreszenzmarkierten SAP90 und DLG in transient transfizierten HEK 293-Zellen

A- Carboxyterminal YFP markiertes SAP90 zeigt ein cytosolisches Expressionsmuster.
B- Carboxyterminal YFP markiertes DLG zeigt ein cytosolisches Expressionsmuster in transient transfizierten HEK 293-Zellen. Die Länge der weißen Balken entspricht 20 µm. PK, Phasenkontrast; YFP, YFP-Kanal

Nach transients Transfektion von carboxyterminal fluoreszenzmarkiertem *scribble* konnte ein membranäres Expressionsmuster beobachtet werden (Abbildung 27). Diese Lokalisation ist jedoch unabhängig vom Auftreten von Zell-Zell Kontakten immer zu beobachten. Die Koexpression der Gerüstproteine *scribble* und DLG verdeutlicht die membranäre Lokalisation von *scribble* und die cytosolische Lokalisation von DLG. Beide Proteine sind nicht im Zellkern von transient transfizierten HEK 293-Zellen zu finden.

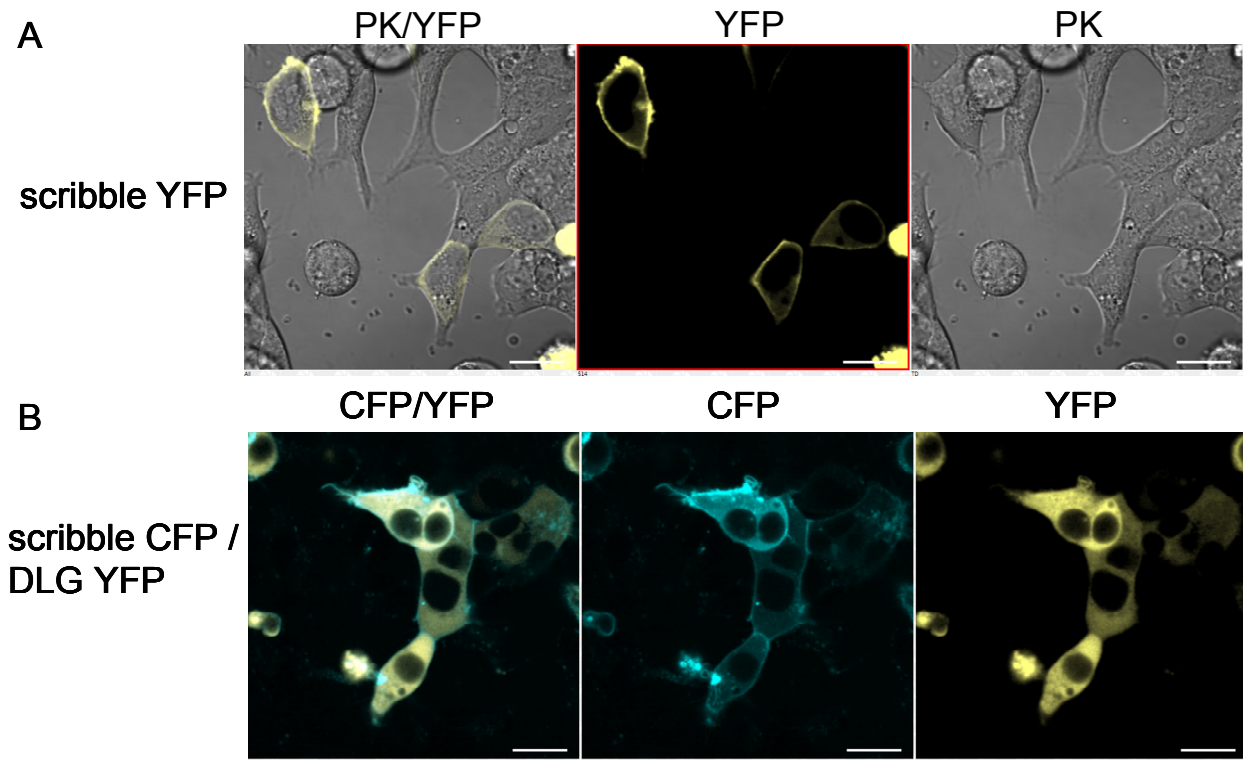
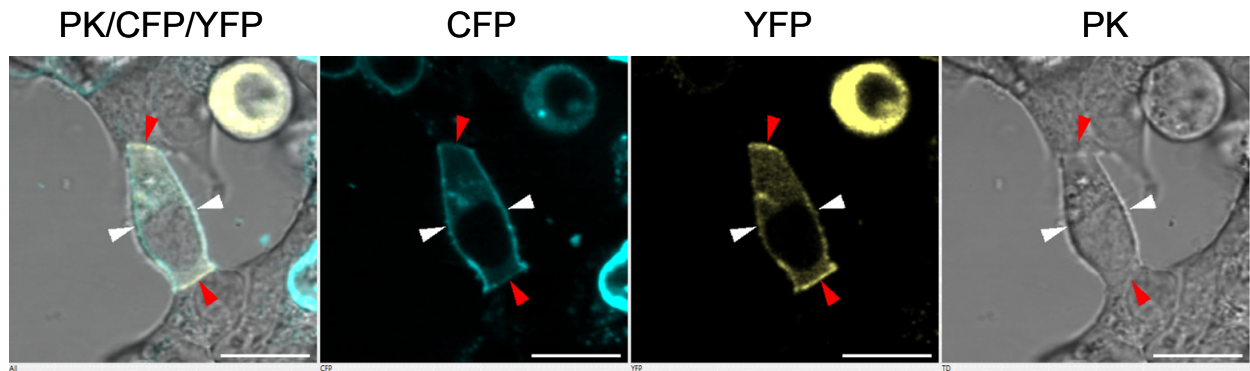


Abbildung 27: Membranäre Lokalisation von fluoreszenzmarkiertem *scribble* in HEK 293-Zellen
A- Fluoreszenzmarkiertes *scribble* zeigt eine Lokalisation an der Zellmembran. Die gezeigten Zellen weisen Membranabschnitte mit und ohne direkten Kontakt zu einer Nachbarzelle auf. In beiden Fällen ist eine identische Lokalisation an der Membran zu erkennen. **B-** Die Koexpression von CFP markiertem *scribble* und YFP markiertem DLG zeigt die unterschiedliche Lokalisation der beiden Gerüstproteine. Die Länge der weißen Balken entspricht 20 µm. PK, Phasenkontrast; CFP, CFP-Kanal; YFP, YFP-Kanal

Die mikroskopischen Untersuchungen von fluoreszenzmarkierten Gerüstproteinen, die potenzielle Interaktionspartner der α_2 -Untereinheit sein könnten, ergaben, dass ausschließlich *scribble* eine membranäre Lokalisation aufweist. Die membranäre Lokalisation von *scribble* scheint jedoch nicht, wie es bei dem $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ Fusionsprotein zu beobachten war, auf Zell-Zell Kontakte beschränkt zu sein. Deshalb sollte nachfolgend durch Koexpression beider Proteine untersucht werden, ob *scribble* und $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ kolokalisieren. Dazu wurden HEK 293-Zellen mit beiden cDNAs transfiziert und am konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht. Die Untersuchung von Zellen, die speziell Zell-Zell Kontakte sowie Bereiche ohne einen direkten Kontakt zu einer Nachbarzelle aufwiesen, zeigten, dass *scribble* an der Membran lokalisiert ist, während $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ weiterhin nur an Membranabschnitten mit Zell-Zell Kontakten vorkommt (Abbildung 28).



scribble CFP / $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$

Abbildung 28: Koexpression von $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ und scribble CFP in HEK 293-Zellen

CFP markiertes *scribble* ist an der gesamten Membran der Zelle lokalisiert, auch an Abschnitten, an denen es keinen Kontakt zu einer Nachbarzelle gibt (weiße Pfeile). Die YFP markierte α_2 Enzymisoform ist vermehrt an Membranabschnitten mit direkten Kontakt zu einer Nachbarzelle (rote Pfeile) lokalisiert. Die Länge der weißen Balken entspricht 20 μm . PK, Phasenkontrast; CFP, CFP-Kanal; YFP, YFP-Kanal

Von den untersuchten Gerüstproteinen mit PDZ Domänen wies nur *scribble* eine membranäre Lokalisation auf, während SAP90 und DLG cytosolisch vorliegen in transient transfizierten HEK 293-Zellen. Die Koexpression von *scribble* mit dem $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ Fusionsprotein zeigt, dass sich auch in Anwesenheit von *scribble* die Lokalisation der α_2 -Isoform auf Membranabschnitte mit Zell-Zell Kontakt beschränkt.

5. Diskussion

5.1 Domänenorganisation in der heterodimeren NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase

In dieser Arbeit wurden fluoreszenzmarkierte Guanylyl-Cyclase Untereinheiten mit der FRET-Methode untersucht, um Informationen über die allgemeine Organisation des Enzyms im Basalzustand sowie potenzielle dynamische Veränderungen bei der Aktivierung zu erhalten. Kristallstrukturen von Sequenzhomologen der Domänen der Guanylyl-Cyclase gaben Einblicke in die Struktur und möglichen Funktionen dieser isolierten Domänen [84-87, 93, 184]. Durch das Fehlen von strukturellen Informationen des gesamten heterodimeren Guanylyl-Cyclase Holoproteins, ist die relative Position dieser Domänen zueinander jedoch unbekannt.

Ein Energietransfer zwischen den Fluorophoren der fluoreszierenden Proteine tritt bei einem Abstand von 10-80 Å auf [185]. Die fluoreszierenden Proteine bilden eine zylindrische Struktur aus, die 42 Å lang ist und einen Durchmesser von 24 Å hat [186]. Die Fluorophore liegen in der Mitte des Zylinders, was dazu führt, dass der Abstand zwischen den Fluorophoren im Wildtyp GFP-Dimer 25 Å ist [176]. Die Dimensionen der Guanylyl-Cyclase Domänen auf Basis der Kristallstrukturen von Guanylyl-Cyclase Homologen (H-NOX, PDB ID 2O09 [86], PAS, PDB 2P04 [87] ID, cat, PDB ID 3ET6 [93]) und der *coiled coil* Domäne der β_1 -Untereinheit (PDB ID 3HLS [184]) sind in Abbildung 29 gezeigt. Demnach bilden die katalytischen Domänen eine große, kompakte Struktur am Carboxyterminus der Untereinheiten. Aminoterminal der katalytischen Domänen befindet sich die *coiled coil* Domäne, die eine ca. 80 Å lange helikale Struktur aufweist, gefolgt von den PAS-Domänen und den H-NOX Domänen. Auf der Basis von Homologen isolierter Domänen hätte der Enzymkomplex in einem gestreckten Zustand eine Länge von über 200 Å (siehe Abbildung 29).

Nach Koexpression carboxyterminal fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Untereinheiten (CC) wurde eine FRET-Effizienz von 15 % - 20 % ermittelt, was einem Abstand von 62 Å bis 66 Å zwischen den fluoreszierenden Proteinen entspricht. Diese Abstände passen gut zu dem Abstand zwischen den Carboxytermini innerhalb der dimeren katalytischen Domäne der Guanylyl-Cyclase

aus *Chlamydomonas reinhardtii*, die etwa 60 Å voneinander entfernt und in entgegengesetzte Richtungen orientiert sind [93]. Auf der Basis der FRET-Untersuchungen ist ein fluoreszierendes Protein am Aminoterminus der β_1 -Untereinheit 64 Å - 69 Å von einem fluoreszierenden Protein am Carboxyterminus der α -Untereinheit entfernt (CN). Dieser Abstand ist nur um wenige Ångström größer als der Abstand zwischen den fluoreszierenden Proteinen am Carboxyterminus der Untereinheiten. Ebenso ist der berechnete Abstand zwischen dem Fluorophor am Aminoterminus der α -Untereinheit und dem Fluorophor am Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit (NC) zwischen 71 Å - 74 Å entfernt. Diese Abstände zwischen den fluoreszierenden Proteinen am Carboxyterminus und Aminoterminus der Untereinheiten (CN, NC) entsprechen dem Abstand, den eine helikale Proteinstruktur aus 28- bzw. 48 Aminosäuren zwischen den fluoreszierenden Proteinen erzeugen würde. Ausgehend davon, dass die helikale, 65 Aminosäuren lange *coiled coil* Domäne die katalytische Domäne von der PAS bzw. H-NOX Domäne trennt (siehe Abbildung 29 A), wäre eine ähnlich gestreckte Struktur wie die der membranständigen Guanylyl-Cyclase denkbar (siehe Abbildung 30 A).

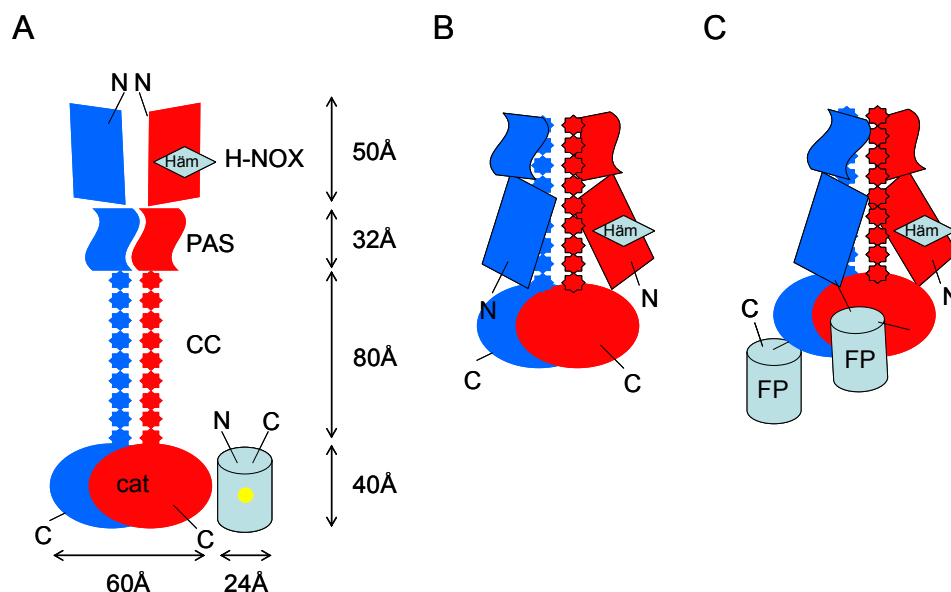


Abbildung 29: Modelle der Domänenorganisation des heterodimeren Guanylyl-Cyclase Enzymkomplexes

Die Dimensionen der Domänen wurden auf der Basis der Kristallstrukturen isolierter Domänen der Guanylyl-Cyclase und homologer Proteine bestimmt (**A**). Die α -Untereinheit ist blau gekennzeichnet und die β_1 -Untereinheit rot. **B**- Domänenanordnung auf der Basis der FRET-Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Heterodimeren. **C**- Mögliche Konformation des funktionellen Guanylyl-Cyclase Fusionsproteins β_1 YFP α CFP. cat, katalytische Domäne; CC, *coiled coil* Domäne; PAS, Per/Arnt/Sim-Domäne; H-NOX, *Heme Nitric oxide/Oxygen binding* Domäne; FP, fluoreszierendes Protein

Aufgrund der berechneten Abstände zwischen den fluoreszierenden Proteinen an den Termini der Untereinheiten muss der Enzymkomplex jedoch eine kompaktere Struktur aufweisen als für die membranständige Guanylyl-Cyclase angenommen. Es wäre zu vermuten, dass die aminoterminalen H-NOX Domänen beider Untereinheiten sich in räumlicher Nähe oder sogar im direkten Kontakt zur katalytischen Domäne befinden (Abbildung 29 B).

Untersuchungen von Winger und Marletta zeigten, dass die Anwesenheit einer isolierten β_1 H-NOX Domäne einen Einfluss auf die Aktivität eines Dimers bestehend aus den katalytischen Domänen der α_1 - und β_1 -Untereinheit hat [89]. Daher kann eine Regulation der Enzymaktivität durch einen direkten Kontakt zwischen der H-NOX Domäne der β_1 -Untereinheit und der katalytischen Domäne vermutet werden. Die Ergebnisse aus den FRET-Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigen, dass die β_1 H-NOX Domäne sich in räumlicher Nähe zur katalytischen Domäne befindet. Dabei ist die Distanz nur um wenige Ångström größer als zwischen den Carboxytermini der Untereinheiten innerhalb der katalytischen Domäne. Das unterstützt die Hypothese, dass die Organisation des Enzymkomplexes eine direkte Interaktion zwischen der Aminoterminalen regulatorischen Domäne und der Carboxyterminalen katalytischen Domäne erlaubt. In Homologie zu der H-NOX Domäne der β_1 -Untereinheit besitzen auch die α -Untereinheiten eine aminoterminal H-NOX Domäne. Jedoch ist die Funktion der α H-NOX Domänen bisher noch unklar. Während die β_1 H-NOX Domäne über das koordinierende Histidin Häm bindet [67-68], fehlt dieses Histidin in den H-NOX Domänen der α -Untereinheiten. Untersuchungen zeigten, dass die H-NOX Domäne der β_1 -Untereinheit ausreichend für die Hämbindung ist [66]. Die Deletion der H-NOX Domäne der α -Untereinheit hat keinen Einfluss auf die Stimulation der Enzymaktivität durch NO und das Absorptionsspektrum des Häms im Enzym [81-82]. Es gibt noch weitere H-NOX Domänen, denen das hämbindende Histidin fehlt, so z.B. bakterielle H-NOX Domänen von *Rhodobacter sphaeroides* und *Magnetococcus* Arten (Rhsp 22958463, 22999020 MCSP) [187]. Es ist denkbar, dass diese Domänen in der Evolution konserviert wurden und als Bindungsstellen für noch nicht identifizierte Liganden dienen.

Die α_1 -Untereinheit der Guanylyl-Cyclase kommt beim Menschen in drei verschiedenen *splice*-Varianten vor [82]. Zwei dieser Varianten bilden unterschiedlich große Abschnitte der aminoterminalen H-NOX Domäne aus (N1/N2- α_1), während einer weiteren Variante die aminoterminal H-NOX Domäne fehlt (C- α_1). Funktionelle Analysen zeigten, dass die isolierten H-NOX Domänen (N1/N2- α_1) einen dominant negativen Effekt haben, während die C- α_1 Variante ein funktionelles Heterodimer mit der β_1 -Untereinheit bildet [82]. Aufgrund dieser Ergebnisse vermuteten die Autoren, dass diese *splice*-Varianten einen neuen Mechanismus der Regulation der Enzymaktivität darstellen. Weiterhin könnte man spekulieren ob die verschiedenen Varianten *in vivo* bisher unbekannte Funktionen in Abhängigkeit von der Anwesenheit einer α_1 H-NOX Domäne im heterodimeren Enzymkomplex haben.

Die FRET-Untersuchungen am heterodimeren Enzym lassen eine direkte Interaktion zwischen der α H-NOX Domäne und der katalytischen Domäne vermuten. Die Fusion mittels eines fluoreszierenden Proteins, sowie die direkte Fusion des Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit an den Aminotermus der α -Untereinheit, führt zur Bildung eines funktionellen Enzyms ohne signifikante Unterschiede im Vergleich zu dem heterodimeren Enzymkomplex (Haase N. *et al.* Manuskript eingereicht). In Analogie zu einer direkten Interaktion zwischen β_1 H-NOX Domäne und katalytischer Domäne wäre daher auch eine Regulation über die α H-NOX Domäne denkbar. Zur Identifizierung von Aminosäuren, die für die Dimerisierung der Guanylyl-Cyclase Untereinheiten verantwortlich sind, verwendeten Rothkegel *et al.* einen BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*) Ansatz [91]. Bei dieser Methode wird jeweils nur eine Hälfte eines fluoreszierenden Proteins mit dem zu untersuchenden Proteinen fusioniert. Kommen die beiden Hälften der fluoreszierenden Proteine bei einer Interaktion in räumliche Nähe, wird das fluoreszierende Protein funktionstüchtig und fluoresziert. Mit diesem experimentellen Ansatz konnte eine Komplementierung des fluoreszierenden Proteins beobachtet werden, wenn die Hälften der fluoreszierenden Proteine am Carboxyterminus (CC) und am Aminotermus (NN) der α_1 - und β_1 -Untereinheit fusioniert waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass im α_1/β_1 Isoenzym die Carboxytermini und Aminotermi der Untereinheiten in räumlicher Nähe sind. Dieses Ergebnis konnte in unseren FRET-Untersuchungen bestätigt werden, bei denen die höchste FRET-Effizienz zwischen fluoreszierenden Proteinen am Carboxyterminus (CC) und Aminotermus (NN) der Untereinheiten des α_1/β_1

Isoenzym beobachtet werden konnte. Untersuchungen zur räumlichen Organisation mit der in dieser Arbeit vorgestellten FRET-Methode zeigten darüber hinaus auch eine räumliche Nähe zwischen den regulatorischen und katalytischen Domänen (CN, NC) der Untereinheiten. Diese räumliche Nähe konnte mit dem BiFC Ansatz nicht gezeigt werden [91]. Bei Rothkegel *et al.* entstand bei der Fusion an den Carboxytermini (CC) der Untereinheiten ein inaktives Enzym, während bei der Fusion am Aminoterminus (NN) enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in unseren Versuchen NO-stimulierte Enzymaktivität bei den carboxyterminal markierten Untereinheiten (CC), aber nicht bei den aminoterminal markierten Untereinheiten (NN) gemessen werden. Die fehlende Enzymaktivität in dem carboxyterminal markierten Konstrukt bei Rothkegel *et al.* könnte durch die Interaktion der beiden Hälften der fluoreszierenden Proteine und dadurch ausgelöste sterische Veränderungen in der Nähe der katalytischen Domäne des Enzyms verursacht sein. Während bei dieser Studie die aminoterminal markierten Varianten Enzymaktivität aufwiesen, konnten wir nach Fusion eines fluoreszierenden Proteins an den Aminoterminus der β_1 -Untereinheit, bedingt durch die Hämdefizienz, nur basale Aktivität nachweisen. Eine fehlende NO-Stimulierbarkeit aminoterminal β_1 markierter Untereinheiten wurde auch schon in früheren Arbeiten festgestellt [188-189]. Im Gegensatz zu allen anderen Studien wurde in der Arbeit von Rothkegel *et al.* die Enzymaktivität in einer cGMP Reporterzelllinie gemessen. Möglicherweise ist das intrazelluläre Milieu der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse, was wiederum für einen bisher unbekannten intrazellulären Interaktionspartner der H-NOX Domänen der Guanylyl-Cyclase sprechen würde. Untersuchungen mit dem cGMP Sensor YFP-GAFA-CFP belegten, dass eine dynamische FRET-Veränderung mit unserem Aufbau messbar ist. Weder in der Studie von Rothkegel *et al.* noch in unseren Untersuchungen konnte eine Veränderung der Fluoreszenz bzw. des FRET bei Stimulation des Enzyms beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse muss man davon ausgehen, dass die Konformationsänderung bei Stimulierung des Enzyms eher klein ist. Auf Basis der Daten von Winger und Marletta [89] müsste eine Konformationsänderung am ehesten zwischen der β_1 H-NOX Domäne und der katalytischen Domäne zu beobachten sein. Da jedoch die Fusion eines fluoreszierenden Proteins an den Aminoterminus der β_1 -Untereinheit zu einem hämdefizienten Enzymkomplex führte,

der darüber hinaus nicht durch Cinaciguat aktiviert werden kann, ist in dieser Konstellation keine FRET-Veränderung zu erwarten.

Neben der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, die im Cytosol oder membranassoziiert vorliegen können, existieren noch membranständige Guanylyl-Cyclasen. Die membranständigen Guanylyl-Cyclasen gehören zu der Familie der Guanylyl-Cyclase gekoppelten Rezeptoren, zu denen auch der Guanylin- und Enterotoxin-Rezeptor [190] sowie retinale Guanylyl-Cyclasen [191] und Guanylyl-Cyclasen der Geruchszellen zählen [192]. Ein Vertreter der Guanylyl-Cyclase gekoppelten Rezeptoren ist der Rezeptor für natriuretische Peptide (ANP-Rezeptor). Er besteht aus einem extrazellulären, natriuretische Peptid-bindenden Teil und aus einem intrazellulären Teil, bestehend aus einer Kinase-homologen Domäne und der katalytischen Guanylyl-Cyclase Domäne (zur Übersicht siehe [193]). Diese Rezeptoren bilden aktive Homodimere aus, bei denen die extrazelluläre Ligandenbindung und die katalytische Guanylyl-Cyclase Domäne klar voneinander getrennt sind. Es wird vermutet, dass beim ANP-Rezeptor das Signal nach Bindung des Liganden durch einen Rotationsmechanismus an die katalytischen Domänen weitergegeben wird (Abbildung 30 A). Dabei löst die Bindung von natriuretischen Peptiden eine Rotation aus, die im intrazellulären Teil des Rezeptors für eine optimale Positionierung der aktiven Zentren beider Untereinheiten sorgt und so die Umwandlung von GTP zu cGMP stimuliert [88]. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase vorstellbar, bei der die aminoterminalen regulatorischen Domänen durch die PAS Domänen und die *coiled coil* Regionen von der katalytischen Domäne getrennt werden. Allerdings sprechen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde gegen einen solchen strukturellen Aufbau.

Die cytosolisch vorliegende Proteinkinase G I (PKG I), ist das wichtigste cGMP Effektorprotein und ein intensiv untersuchter dimerer Enzymkomplex. In Abwesenheit einer Kristallstruktur wird für das PKG I Homodimer eine Struktur postuliert, bei dem die aminoterminalen Domänen durch einen direkten Kontakt zur carboxyterminalen katalytischen Domäne die Aktivität des Enzyms regulieren [194]. Die Autoinhibition der aminoterminalen Pseudosubstratdomänen im inaktiven Zustand des Enzyms wird durch die Bindung von cGMP aufgelöst, wodurch die substratbindenden, katalytischen Domänen frei werden (Abbildung 30 B).

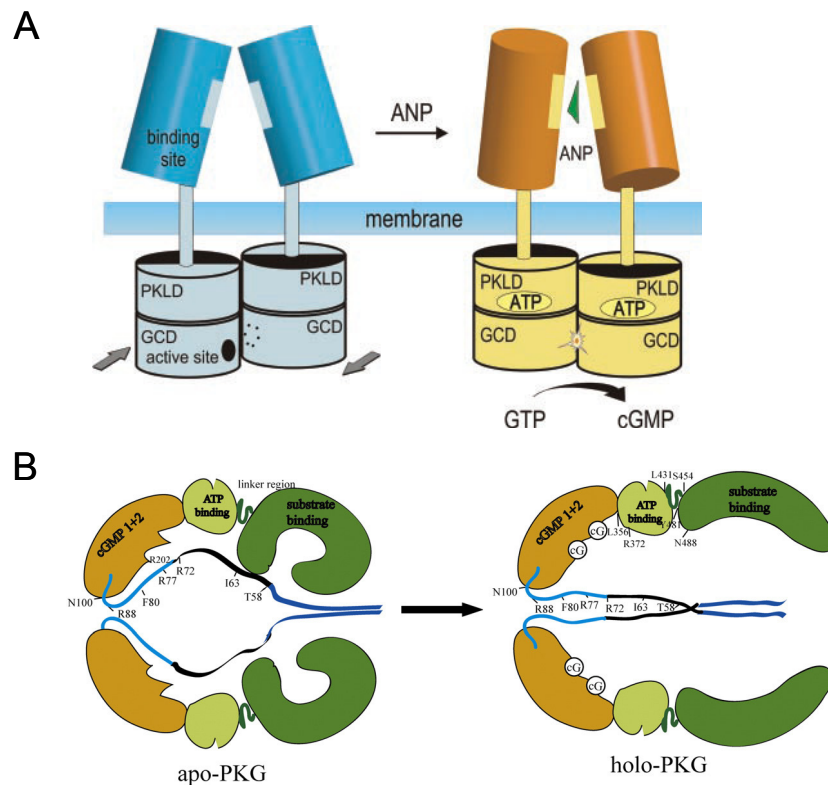


Abbildung 30: Postulierte Aktivierungsmechanismen der membranständigen Guanylyl-Cyclase und der Proteinkinase G (aus [88, 194])

A- Durch die Bindung von natriuretischen Peptiden (ANP) an die extrazellulären Domänen des enzymgekoppelten Rezeptors wird eine Rotationsbewegung ausgelöst, die zu den intrazellulären katalytischen Domänen weitergegeben wird. Nach der Bindung von ATP an die Proteinkinase-ähnlichen regulatorischen Domänen (protein kinase like domains; PKLD) bringt diese Orientierungsänderung die aktiven Bereiche der katalytischen Domänen in eine optimale Position für die enzymatische Umwandlung von GTP zu cGMP [88]. **B-** Hypothetische Konformationsänderung nach cGMP vermittelter Aktivierung der PKG I [194]. Nach Bindung von cGMP an die PKG kommt es zu einer Konformationsänderung bei der die aminoterminalen autoinhibitorischen Domänen die carboxyterminalen substratbindenden Domänen frei geben.

Während bei membranständigen, rezeptorgekoppelten Enzymen die regulatorische und katalytische Domäne durch die Zellmembran getrennt vorliegen, ist diese Trennung bei cytosolischen Enzymen nicht notwendig. Dadurch ergeben sich für membranständige und cytosolische Enzymkomplexe unterschiedliche Mechanismen der Aktivierung. Da die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase nicht in einen extrazellulären und intrazellulären Teil getrennt ist, wäre es denkbar, dass die Struktur vergleichbar mit anderen dimeren, cytosolisch vorliegenden Enzymen ist. Die FRET Ergebnisse sprechen für eine vergleichbare Domänenanordnung wie bei der PKG I, bei der die aminoterminalen regulatorischen Domänen in räumlicher Nähe zur carboxyterminalen katalytischen Domäne sind. Daher ist anzunehmen, dass Struktur

und Aktivierung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase eher vergleichbar mit cytosolischen Enzymen sind, als mit rezeptorgekoppelten Guanylyl-Cyclasen.

Die Analyse von Kristallstrukturen isolierter H-NOX Domänen mit NO- und CO-Häm sowie ohne Ligandenbindung gaben einen Einblick in mögliche Konformationsänderungen der β_1 H-NOX Domäne der Guanylyl-Cyclase nach Bindung von NO an die prosthetische Hämgruppe [84-86]. Die Untersuchungen zeigen, dass es nach Bindung von NO an die Hämgruppe zu einer Verschiebung der aminoterminalen Helices auf der distalen Seite der prosthetischen Hämgruppe kommt [86]. Die Voraussetzung für die Übertragung dieser Konformationsänderung auf die katalytische Domäne wäre eine spezielle Struktur innerhalb der katalytischen Domäne, die eine Protein-Protein Interaktion erlaubt. Ein vergleichbares Modell für diese Hypothese ist die Interaktion zwischen Adenylyl-Cyclase und G-Protein [195]. Durch direkte Protein-Protein Interaktion zwischen G-Protein und einer Bindungsstelle an der katalytischen Domäne der Adenylyl-Cyclase kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch die aktiven Zentren in eine optimale Position für die Umsetzung von ATP zu cAMP gebracht werden (Abbildung 31 A). Durch die Analyse der Kristallstruktur einer Guanylyl-Cyclase aus *Chlamydomonas reinhardtii* und Vergleich mit der homologen katalytischen Domäne der Adenylyl-Cyclasen, konnte eine potenzielle Bindungsstelle für regulatorische Proteine identifiziert werden [93] (siehe Abbildung 31 B). Die Autoren postulieren, dass über diese Bindungsstelle die Interaktion zwischen der H-NOX Domäne und der katalytischen Domäne stattfindet. Auf diese Weise könnte die Konformationsänderung in der β_1 H-NOX Domäne direkt übertragen werden und eine Konformationsänderung in der katalytischen Domäne auslösen.

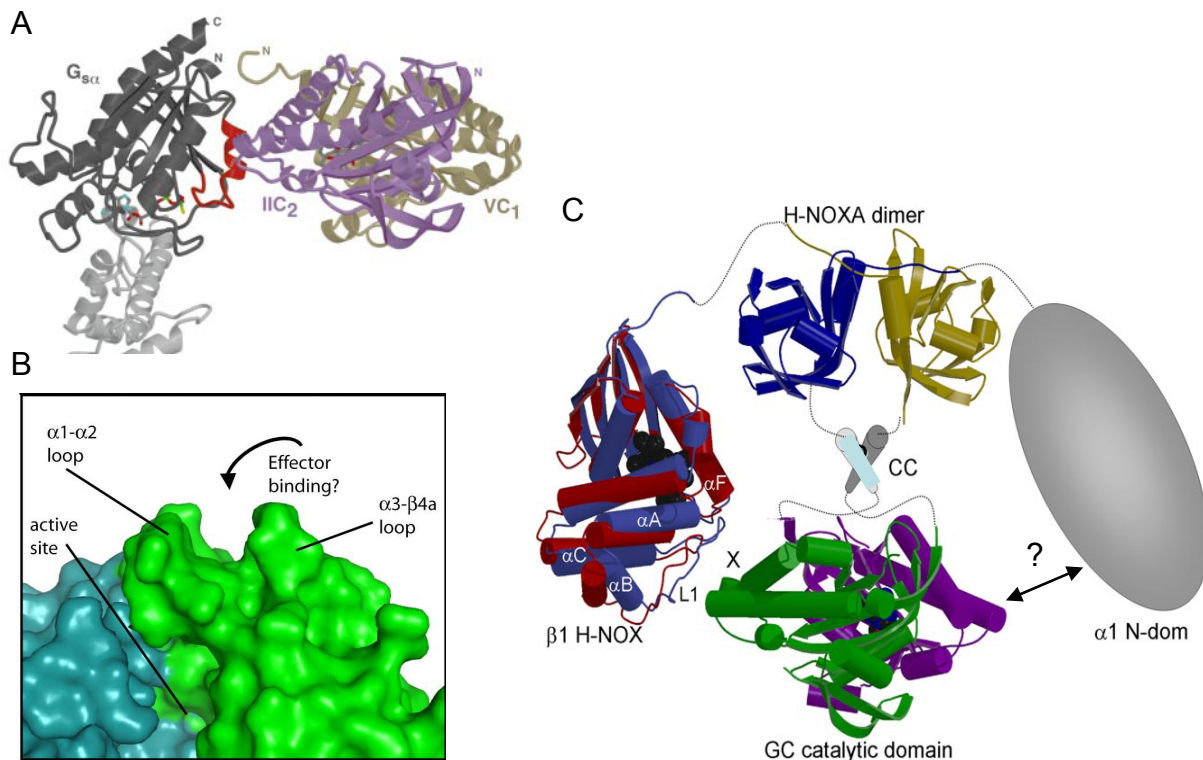


Abbildung 31: Mögliche Protein-Protein Interaktion zwischen den regulatorischen Domänen und der katalytischen Domäne der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (nach [87, 93, 195])

A- Interaktion zwischen dem stimulierenden G-Protein $G_{s\alpha}$ (links) und der katalytischen Domäne der Adenylyl Cyclase (rechts) [195]. **B-** Postulierte Effektorbindungsstelle innerhalb der homodimeren katalytischen Domäne einer Guanylyl-Cyclase aus *Chlamydomonas reinhardtii* [93]. **C-** Modell der Domänenanordnung innerhalb der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase auf Basis der Kristallstruktur isolierter homologer Domänen (nach [86]). Die β_1 H-NOX Domäne ist dargestellt in der basalen Konformation (rot, [86]) und der aktiven Konformation (blau, [85]). In Analogie zu der Adenylyl Cyclase, ist die H-NOX Domäne so positioniert, dass eine Interaktion mit der katalytischen Domäne möglich ist. Auf Basis der FRET Daten und der Fusion der Guanylyl-Cyclase Untereinheiten zwischen dem β_1 Carboxyterminus und dem α Aminotermius ist auch eine Interaktion mit der regulatorischen Domäne der α -Untereinheit (α_1 N-dom) denkbar („?“). Die gezeigte Domänenanordnung basiert zum großen Teil auf der Struktur des STKH PAS-Dimers, welches Homologie zu den PAS Domänen der Guanylyl-Cyclase (H-NOXA dimer) aufweist [87].

Die PAS Domäne und die *coiled coil* Region sind nachweislich für die Heterodimerisierung der Untereinheiten verantwortlich [87, 90-91]. Die Kristallstrukturen des STHK (*signal transduction histidin kinase*) PAS-Dimers aus *Nostoc punctiforme* [87] und der isolierten *coiled coil* Region der β_1 -Untereinheit [184] gaben einen Einblick in die mögliche Domänenanordnung des Guanylyl-Cyclase Heterodimers (siehe Abbildung 31 C). Demnach könnten die PAS Domänen neben der Dimerisierung der Untereinheiten auch die korrekte Positionierung und Orientierung der H-NOX Domänen vermitteln. Die Untersuchung verschiedener Deletionen innerhalb der PAS Domänen der β_1 - und α_1 -Untereinheit zeigten, dass die Auswirkungen auf die Heterodimerisierung und die Enzymaktivität durchaus

unterschiedlich sein können: Während Deletionen innerhalb der β_1 PAS Domäne einen Verlust der Dimerisierungsfähigkeit und damit der Enzymaktivität zur Folge hatten, waren bei zwei Deletionen innerhalb der α_1 PAS Domäne ($\Delta 283-292$ und $\Delta 373-382$) eine erhöhte Enzymaktivität und Sensitivität gegenüber Riociguat (BAY 42-2272) in Anwesenheit von NO beobachtet worden [91]. Untersuchungen an Deletionsmutanten der α -Untereinheiten zeigten, dass die Region zwischen den Aminosäuren 259 und 364 der α_1 -Untereinheit essenziell für die Stimulation des Enzyms durch NO und YC-1 ist [81]. Deletionsmutanten der α_2 -Untereinheit zeigten, dass eine Region zwischen den Aminosäuren 247 und 401 für die Stimulation durch das YC-1 Derivat BAY 41-2272 verantwortlich ist [83]. Beide Bereiche befinden sich innerhalb der PAS Domäne der α -Untereinheiten. Durch Photoaffinitätsmarkierung der Untereinheiten konnten die Cysteine 238 und 243 als Bindungsstellen für BAY 41-2272 identifiziert werden [139, 196]. Beide Positionen befinden sich am carboxyterminalen Ende der α_1 H-NOX Domänen am Übergang zur PAS Domäne. Dies lässt vermuten, dass die H-NOX und die PAS Domäne der α -Untereinheiten die Bindungsstellen der NO-unabhängigen, hämabhängigen Guanylyl-Cyclase-Modulatoren darstellen. Darüber hinaus wäre es auch möglich, dass die durch ATP, GTP und cGMP induzierte allosterische Regulation der Enzymaktivität über die Bindung an die PAS Domänen oder die α H-NOX Domäne vermittelt wird.

Es konnte gezeigt werden, dass durch Nitrosylierung des Cysteins 243 der α_1 -Untereinheit und Cysteins 122 der β_1 -Untereinheit die Aktivität der Guanylyl-Cyclase beeinflusst wird [80]. Während die Nitrosylierung innerhalb der β_1 H-NOX einen direkten Einfluss auf die prothetische Hämgruppe haben kann, könnte die Nitrosylierung des Cysteins 243 der α_1 -Untereinheit durch eine direkte Interaktion zwischen H-NOX Domäne und katalytischer Domäne zustande kommen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die PAS Domänen der α -Untereinheiten, möglicherweise über die Steuerung einer direkten Interaktion zwischen α H-NOX Domäne und katalytischer Domäne, einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben. So wäre es denkbar, dass in Analogie zu der Stimulierung über die β_1 H-NOX Domäne die α H-NOX Domänen einen inhibierenden Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Dieser inhibierende Einfluss könnte durch die Bindung von Liganden an die α PAS Domäne aufgelöst werden.

5.2 Fusion der Guanylyl-Cyclase Untereinheiten

Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Fusion des Carboxyterminus der β_1 -Untereinheit mit dem Aminoterminal der α -Untereinheit mittels eines fluoreszierenden Proteins entstand ein monomeres Konstrukt, welches die beiden Dimerisierungspartner und ein fluoreszierendes Protein beinhaltet. Die fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine zeigten basale, NO- und NO/YC-1 stimulierte Enzymaktivität in cytosolischer Fraktion von Sf9-Zellen. Ein *Strep*-markiertes β_1 YFP α_2 Fusionsprotein wurde mittels Affinitätschromatographie angereinigt und Aktivierung durch NO und den hämunabhängigen Guanylyl-Cyclase Aktivator Cinaciguat wurde nachgewiesen. Dadurch kann eine räumliche Nähe der α H-NOX zur katalytischen Domäne im aktiven Enzymkomplex vermutet werden. Weitere Fusionsproteine, bei denen die Untereinheiten direkt miteinander fusioniert wurden ($\beta_1\alpha_1$, $\beta_1\alpha_2$), zeigten nach eingehender Analyse in cytosolischer Fraktion sowie nach Anreinigung keine signifikanten Unterschiede zu den entsprechenden heterodimeren Enzymkomplexen (α_1/β_1 , α_2/β_1) (Haase N. *et al.* Manuskript eingereicht). Die rekombinante Expression eines funktionellen Enzymkomplexes der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase erfordert die Koexpression beider Untereinheiten. Dabei bilden die α - und β_1 -Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase zu den funktionellen Heterodimeren auch inaktive Homodimere (α_1/α_1 , α_2/α_2 , β_1/β_1) [189] (Haase N. *et al.* Manuskript eingereicht). Die Bildung inaktiver Homodimere nach rekombinanter Expression erschwert die Untersuchung des aktiven heterodimeren Enzymkomplexes *in vitro*. Die neuartigen Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine ermöglichen die rekombinante Expression reiner Heterodimere mit 1:1 Stöchiometrie von β_1 - und α -Untereinheit.

Darüber hinaus ermöglichen die Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine die isoformspezifische Untersuchung des Enzyms in lebenden Zellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die fluoreszierenden Proteine zwischen den Guanylyl-Cyclase Untereinheiten und carboxyterminal der Untereinheit in einem funktionellem Zustand vorliegen und daher für Untersuchungen zum räumlichen- und zeitlichen Nachweis des Guanylyl-Cyclase Heterodimers genutzt werden können. Mithilfe der Fusionsproteine ist es weiterhin möglich stabil transfizierte Zelllinien sowie transgene Tiere zur gezielten Überexpression einer Enzymisoform zu generieren ohne das es

zur Bildung von inaktiven Homodimeren oder einzelnen nicht dimerisierten Untereinheiten kommt.

5.3 Isoformspezifische Lokalisation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase

Untersuchungen zur Expression der Guanylyl-Cyclase im Rattenhirn zeigen, dass es *in vivo* ein Reservoir nicht heterodimerisierter Untereinheiten gibt [197]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *in vivo* die Enzymaktivität durch ein Gleichgewicht aktiver Heterodimere und inaktiver Homodimere bzw. einzelner Untereinheiten reguliert wird. Außerdem werden weitere Funktionen der Homodimere oder der nicht dimerisierten, einzelnen Untereinheiten diskutiert [198]. Die fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine bieten die Möglichkeit, die reinen Heterodimere isoformspezifisch in der lebenden Zelle zu untersuchen. Nach transienter Transfektion von HEK 293-Zellen mit den cDNA kodierend für die Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine konnte die Expression der Proteine und die spezifische Fluoreszenz in lebenden Zellen gezeigt werden. Transfizierte Zellen zeigten keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen. Die α_1 -Isoform der fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine zeigte ein cytosolisches Expressionsmuster. Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns, wie es bei den unfusionierten fluoreszierenden Proteinen der Fall ist, war nicht zu beobachten. Untersuchungen in Cardiomyocyten zeigten eine Assoziation der α_1/β_1 Isoform mit der Zellmembran, in Abhängigkeit ihres Aktivierungszustandes sowie der zellulären Ca^{2+} Konzentration [199-200]. Eine membranäre Lokalisation der α_1 Enzymisoform konnte unter den hier verwendeten Kulturbedingungen in HEK 293-Zellen nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zur α_1 -Isoform zeigte das $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ Fusionprotein eine Lokalisation an der Zellmembran, wobei die membranäre Lokalisation speziell nur an Zell-Zell Kontakten zu beobachten war. An Membranabschnitten ohne einen direkten Kontakt zu einer Nachbarzelle war eine Membranassoziation nicht nachweisbar. Mithilfe unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Fusionsproteine konnte die unterschiedliche zelluläre Lokalisation der heterodimeren Enzymisoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase gezeigt werden.

In früheren Untersuchungen konnten nach rekombinanter Expression keine funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Enzymisoformen festgestellt werden

[55]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass der Carboxyterminus der α_2 -Untereinheit eine PDZ Erkennungssequenz aufweist, über die die α_2/β_1 Isoform mit dem Gerüstprotein PSD 95 (*post synaptic density protein* 95 kDa) interagiert [53, 201]. Es wurde angenommen, dass durch diese Interaktion die α_2 Enzymisoform eine membranassoziierte Lokalisation in Synaptosomen aufweist. Dadurch kommt die α_2 -Untereinheit in die unmittelbare Nähe des NMDA-Rezeptors und der neuronalen NO-Synthase (nNOS), die ebenfalls mit einer der PDZ Domänen von PSD 95 interagieren [202-203]. Mittels spezifischer Antikörper konnte in verschiedenen Zelllinien die α_2 Enzymisoform nach transienter Transfektion an der Plasmamembran nachgewiesen werden [204]. Die Autoren konnten zeigen, dass es durch die Lokalisation der α_2/β_1 Isoform an der Membran zu einer Kompartimentierung des gebildeten cGMP kommt. Dadurch werden cGMP-abhängige Effekte an Membranproteinen viel effektiver durch die α_2/β_1 Enzymisoform vermittelt als durch die cytosolische α_1/β_1 Isoform. Eine vergleichbare Kompartimentierung des sekundären Botenstoffes in der Zelle ist auch für cAMP beschrieben (zur Übersicht siehe [205]).

Unsere Untersuchungen in HEK 293-Zellen zeigen zum ersten Mal, dass die α_2 -Enzymisoform nicht an der gesamten Membran, sondern nur an Zell-Zell Kontakten lokalisiert ist. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die carboxyterminale PDZ Erkennungssequenz der α_2 -Untereinheit für diese spezielle Lokalisation des $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ Fusionsproteins verantwortlich ist. Die Untersuchungen an mutierten Enzymvarianten zeigten, dass die Aktivität und der Hämgehalt des Enzyms keinen Einfluss auf die Lokalisation haben. Nach transienter Transfektion von drei möglichen Interaktionspartnern mit PDZ Domänen, SAP 90, DLG und *scribble*, zeigte nur *scribble* eine membranäre Lokalisation. Nach Koexpression von CFP markiertem *scribble* und $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$, war *scribble* membranär lokalisiert und $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ weiterhin nur an Zell-Zell Kontakten. Die Untersuchungen zeigen, dass die PDZ Erkennungssequenz der α_2 -Untereinheit verantwortlich für die Lokalisation des $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ Fusionsprotein ist. Allerdings scheint keiner der drei untersuchten PDZ Proteine der Interaktionspartner der α_2 -Isoform des Enzyms zu sein. PDZ Domänen sind hoch konservierte Aminosäuresequenzen, die Protein-Protein Interaktionen vermitteln. PDZ Proteine verfügen oft über mehrere PDZ Domänen, was ihnen ermöglicht mit verschiedenen Proteinen gleichzeitig Protein-Protein Interaktionen

einzuweisen. Dadurch bilden sie die Grundlage für den Aufbau größerer Proteinkomplexe, die an einer Vielzahl physiologischer Prozesse in der Zelle beteiligt sind. Der durch PDZ Proteine vermittelte Aufbau von Proteinkomplexen dient der Kompartimentierung der Zelle, indem verschiedene Komponenten eines spezifischen Signalweges in unmittelbare räumliche Nähe gebracht werden. So spielen PDZ Proteine eine wichtige Rolle bei Wachstum, Polarisierung und Differenzierung von Zellen sowie bei der Ausbildung von Synapsen in Nervenzellen [206-208]. Die PDZ vermittelte Lokalisation an Zell-Zell Kontakten weist auf eine mögliche Funktion der α_2/β_1 Isoform der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase im Aufbau oder der Aufrechterhaltung von Zell-Zell Interaktionen hin. Dadurch wäre eine mögliche Rolle in der Polarisierung und Differenzierung von Zellen denkbar.

Durch den Aufbau und die Aufrechterhaltung von synaptosomalen Verbindungen ist der NO/cGMP Signalweg bei Steuerung von Lern- und Gedächtnisprozessen sowie bei verschiedenen Erkrankungen des Nervensystems beteiligt (zur Übersicht siehe [209-210]). Da im Gegensatz zur ubiquitär exprimierten α_1/β_1 Isoform die α_2/β_1 Enzymisoform in hohem Maße im Gehirn vorzufinden ist [56, 211-212], wird eine Schlüsselrolle der α_2 Enzymisoform in NO/cGMP vermittelten Entwicklungs- und Signalweiterleitungsprozessen im Gehirn vermutet [213-215]. So konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten einer der beiden Enzymisoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase die Langzeit-Potenzierung im visuellen Kortex von Mäusen vollständig inhibiert [216-217]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Enzymisoformen jeweils spezifische Prozesse im Gehirn regulieren. Im Gegensatz dazu kann im Herz-Kreislauf System eine Isoform das Fehlen der Anderen kompensieren. Obwohl in den meisten Zellen die α_1 Enzymisoform die vorherrschende ist, haben α_1 defiziente Mäuse zwar geschlechtsspezifisch und in Abhängigkeit von Testosteron einen erhöhten Blutdruck, jedoch wird der blutdrucksenkende Effekt von NO durch das Fehlen der α_1 -Isoform nicht beeinträchtigt [59]. Möglicherweise ist dieses überraschende Ergebnis auf die spezielle Lokalisation der α_2 -Isoform zurückzuführen. So könnte das in benachbarten Endothelzellen gebildete NO durch die an Zell-Zell Kontakten lokalisierte α_2 -Isoform effektiver genutzt werden und so schneller einen physiologischen Effekt auslösen.

6. Zusammenfassung

Die Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase wurden mit fluoreszierenden Proteinen markiert und im Sf9/Baculovirus System exprimiert. Durch die Messung von FRET zwischen den fluoreszierenden Proteinen konnte eine räumliche Nähe zwischen den fluoreszierenden Proteinen am Carboxy- und Aminotermus der Untereinheiten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine räumliche Nähe zwischen den regulatorischen- und katalytischen Domänen des Enzyms. Aufgrund dieser Befunde wurden die Untereinheiten der Guanylyl-Cyclase zwischen β_1 Carboxyterminus und α Aminotermus mittels eines fluoreszierenden Proteins fusioniert. Diese monomeren Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine bildeten nach rekombinanter Expression funktionsfähige Enzymkomplexe, wobei auch das fluoreszierende Protein seine biophysikalischen Eigenschaften behielt. Die fluoreszenten Fusionsproteine erlauben die isoformspezifische rekombinante Expression des Enzyms ohne die Bildung von inaktiven Homodimeren. Mithilfe der fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine konnte eine unterschiedliche Lokalisation der Enzymisoformen in HEK 293-Zellen nachgewiesen werden. Während die α_1 -Isoform cytosolisch vorlag, war die α_2 -Isoform spezifisch an Membranabschnitten mit Zell-Zell Kontakt lokalisiert. Untersuchungen an mutierten Varianten der Fusionsproteine zeigten, dass diese Lokalisation durch die carboxyterminale PDZ Erkennungssequenz der α_2 -Untereinheit vermittelt wird.

7. Literaturverzeichnis

1. Rall, T.W. and E.W. Sutherland, *Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles*. J Biol Chem, 1958. **232**(2): p. 1065-76.
2. Sutherland, E.W. and T.W. Rall, *Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles*. J Biol Chem, 1958. **232**(2): p. 1077-91.
3. Drummond, G.I. and S. Perrott-Yee, *Enzymatic hydrolysis of adenosine 3',5'-phosphoric acid*. J Biol Chem, 1961. **236**: p. 1126-9.
4. Ashman, D.F., et al., *Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine*. Biochem Biophys Res Commun, 1963. **11**: p. 330-4.
5. Goldberg, N.D., S.B. Dietz, and A.G. O'Toole, *Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and urine*. J Biol Chem, 1969. **244**(16): p. 4458-66.
6. Goldberg, N.D., R.F. O'Dea, and M.K. Haddox, *Cyclic GMP*. Adv Cyclic Nucleotide Res, 1973. **3**: p. 155-223.
7. Hardman, J.G., J.W. Davis, and E.W. Sutherland, *Measurement of guanosine 3',5'-monophosphate and other cyclic nucleotides. Variations in urinary excretion with hormonal state of the rat*. J Biol Chem, 1966. **241**(20): p. 4812-5.
8. Broadus, A.E., et al., *Extracellular cyclic nucleotides*. Ann N Y Acad Sci, 1971. **185**: p. 50-66.
9. Bohme, E., K. Munske, and G. Schultz, *[Formation of cyclic guanosine-3',5'-monophosphate in various rat tissues]*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1969. **264**(3): p. 220-1.
10. Hardman, J.G. and E.W. Sutherland, *Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate*. J Biol Chem, 1969. **244**(23): p. 6363-70.
11. Schultz, G., E. Bohme, and K. Munske, *Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity*. Life Sci, 1969. **8**(24): p. 1323-32.
12. White, A.A. and G.D. Aurbach, *Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues*. Biochim Biophys Acta, 1969. **191**(3): p. 686-97.
13. Goridis, C. and I.G. Morgan, *Guanyl cyclase in rat brain subcellular fractions*. FEBS Lett, 1973. **34**(1): p. 71-3.
14. Kimura, H. and F. Murad, *Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart*. J Biol Chem, 1974. **249**(21): p. 6910-6.
15. Kimura, H. and F. Murad, *Localization of particulate guanylate cyclase in plasma membranes and microsomes of rat liver*. J Biol Chem, 1975. **250**(12): p. 4810-7.

-
16. Kaminsky, N.I., et al., *Hormonal effects on extracellular cyclic nucleotides in man*. Trans Assoc Am Physicians, 1970. **83**: p. 235-44.
 17. George, W.J., et al., *Elevation of guanosine 3',5'-cyclic phosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **66**(2): p. 398-403.
 18. Arnold, W.P., et al., *Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(8): p. 3203-7.
 19. Katsuki, S., et al., *Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine*. J Cyclic Nucleotide Res, 1977. **3**(1): p. 23-35.
 20. Miki, N., Y. Kawabe, and K. Kuriyama, *Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide*. Biochem Biophys Res Commun, 1977. **75**(4): p. 851-6.
 21. Schultz, K.D., K. Schultz, and G. Schultz, *Effects of manganese on cyclic GMP levels in the rat ductus deferens*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1977. **298**(3): p. 197-204.
 22. Rapoport, R.M., M.B. Draznin, and F. Murad, *Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation*. Nature, 1983. **306**(5939): p. 174-6.
 23. Rapoport, R.M. and F. Murad, *Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP*. J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res, 1983. **9**(4-5): p. 281-96.
 24. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
 25. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
 26. Deguchi, T. and M. Yoshioka, *L-Arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells*. J Biol Chem, 1982. **257**(17): p. 10147-51.
 27. Hibbs, J.B., Jr., et al., *Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **157**(1): p. 87-94.
 28. Marletta, M.A., et al., *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate*. Biochemistry, 1988. **27**(24): p. 8706-11.
 29. Hevel, J.M., K.A. White, and M.A. Marletta, *Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein*. J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 22789-91.
 30. Furchgott, R.F., *Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide*. Biosci Rep, 1999. **19**(4): p. 235-51.
 31. Ignarro, L.J., *Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology*. Biosci Rep, 1999. **19**(2): p. 51-71.

-
32. Murad, F., *Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling*. Biosci Rep, 1999. **19**(3): p. 133-54.
 33. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
 34. Dudzinski, D.M., et al., *The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. **46**: p. 235-76.
 35. Stuehr, D.J., *Structure-function aspects in the nitric oxide synthases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**: p. 339-59.
 36. Hecker, M., M. Cattaruzza, and A.H. Wagner, *Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells*. Gen Pharmacol, 1999. **32**(1): p. 9-16.
 37. Cho, H.J., et al., *Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages*. J Exp Med, 1992. **176**(2): p. 599-604.
 38. Brune, B., S. Mohr, and U.K. Messmer, *Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMP-independent nitric oxide (NO) signaling pathways*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1996. **127**: p. 1-30.
 39. Liaudet, L., F.G. Soriano, and C. Szabo, *Biology of nitric oxide signaling*. Crit Care Med, 2000. **28**(4 Suppl): p. N37-52.
 40. MacMicking, J.D., et al., *Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. Cell, 1995. **81**(4): p. 641-50.
 41. Wei, X.Q., et al., *Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. Nature, 1995. **375**(6530): p. 408-11.
 42. Hakim, T.S., et al., *Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin*. Physiol Meas, 1996. **17**(4): p. 267-77.
 43. Wood, J. and J. Garthwaite, *Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties*. Neuropharmacology, 1994. **33**(11): p. 1235-44.
 44. Saran, M. and W. Bors, *Signalling by O₂⁻ and NO: how far can either radical, or any specific reaction product, transmit a message under in vivo conditions?* Chem Biol Interact, 1994. **90**(1): p. 35-45.
 45. Waldman, S.A. and F. Murad, *Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system*. J Cardiovasc Pharmacol, 1988. **12 Suppl 5**: p. S115-8.
 46. Humbert, P., et al., *Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method*. Eur J Biochem, 1990. **190**(2): p. 273-8.
 47. Stone, J.R. and M.A. Marletta, *Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states*. Biochemistry, 1994. **33**(18): p. 5636-40.

-
48. Koesling, D., et al., *The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme.* FEBS Lett, 1990. **266**(1-2): p. 128-32.
 49. Koesling, D., et al., *The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase.* FEBS Lett, 1988. **239**(1): p. 29-34.
 50. Harteneck, C., et al., *Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme.* FEBS Lett, 1991. **292**(1-2): p. 217-22.
 51. Yuen, P.S., L.R. Potter, and D.L. Garbers, *A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney.* Biochemistry, 1990. **29**(49): p. 10872-8.
 52. Behrends, S., et al., *A variant of the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein.* J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21109-13.
 53. Russwurm, M., N. Wittau, and D. Koesling, *Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes.* J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44647-52.
 54. Budworth, J., et al., *Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **263**(3): p. 696-701.
 55. Russwurm, M., et al., *Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase.* Biochem J, 1998. **335** (Pt 1): p. 125-30.
 56. Mergia, E., et al., *Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain.* Cell Signal, 2003. **15**(2): p. 189-95.
 57. Koglin, M., et al., *Nitric oxide activates the beta 2 subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit.* J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 30737-43.
 58. Behrends, S. and K. Vehse, *The beta(2) subunit of soluble guanylyl cyclase contains a human-specific frameshift and is expressed in gastric carcinoma.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **271**(1): p. 64-9.
 59. Buys, E.S., et al., *Gender-specific hypertension and responsiveness to nitric oxide in sGCalpha1 knockout mice.* Cardiovasc Res, 2008. **79**(1): p. 179-86.
 60. Friebe, A., et al., *Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7699-704.
 61. Mergia, E., D. Koesling, and A. Friebe, *Genetic mouse models of the NO receptor 'soluble' guanylyl cyclases.* Handb Exp Pharmacol, 2009(191): p. 33-46.
 62. Vermeersch, P., et al., *Soluble guanylate cyclase-alpha1 deficiency selectively inhibits the pulmonary vasodilator response to nitric oxide and increases the pulmonary vascular remodeling response to chronic hypoxia.* Circulation, 2007. **116**(8): p. 936-43.
 63. Ny, L., et al., *Impaired relaxation of stomach smooth muscle in mice lacking cyclic GMP-dependent protein kinase I.* Br J Pharmacol, 2000. **129**(2): p. 395-401.

-
64. Pfeifer, A., et al., *Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice*. *Embo J*, 1998. **17**(11): p. 3045-51.
 65. Mergia, E., et al., *Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1731-7.
 66. Zhao, Y. and M.A. Marletta, *Localization of the heme binding region in soluble guanylate cyclase*. *Biochemistry*, 1997. **36**(50): p. 15959-64.
 67. Zhao, Y., et al., *Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand*. *Biochemistry*, 1998. **37**(13): p. 4502-9.
 68. Wedel, B., et al., *Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(7): p. 2592-6.
 69. Stone, J.R. and M.A. Marletta, *Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase*. *Biochemistry*, 1995. **34**(45): p. 14668-74.
 70. Gerzer, R., et al., *Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper*. *FEBS Lett*, 1981. **132**(1): p. 71-4.
 71. Ballou, D.P., et al., *Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(19): p. 12097-101.
 72. Bellamy, T.C., J. Wood, and J. Garthwaite, *On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 507-10.
 73. Foerster, J., et al., *A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits*. *Eur J Biochem*, 1996. **240**(2): p. 380-6.
 74. Zhao, Y., et al., *A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(26): p. 14753-8.
 75. Bilban, M., et al., *Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling*. *J Mol Med*, 2008. **86**(3): p. 267-79.
 76. Derbyshire, E.R. and M.A. Marletta, *Butyl isocyanide as a probe of the activation mechanism of soluble guanylate cyclase. Investigating the role of non-heme nitric oxide*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(49): p. 35741-8.
 77. Russwurm, M. and D. Koesling, *NO activation of guanylyl cyclase*. *EMBO J*, 2004. **23**(22): p. 4443-50.
 78. Cary, S.P., J.A. Winger, and M.A. Marletta, *Tonic and acute nitric oxide signaling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP, and GTP*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(37): p. 13064-9.
 79. Ruiz-Stewart, I., et al., *Guanylyl cyclase is an ATP sensor coupling nitric oxide signaling to cell metabolism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(1): p. 37-42.

-
80. Sayed, N., et al., *Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(30): p. 12312-7.
 81. Koglin, M. and S. Behrends, *A functional domain of the alpha1 subunit of soluble guanylyl cyclase is necessary for activation of the enzyme by nitric oxide and YC-1 but is not involved in heme binding*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12590-7.
 82. Sharina, I.G., et al., *Alpha1 soluble guanylyl cyclase (sGC) splice forms as potential regulators of human sGC activity*. J Biol Chem, 2008. **283**(22): p. 15104-13.
 83. Koglin, M., J.P. Stasch, and S. Behrends, *BAY 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(4): p. 1057-62.
 84. Nioche, P., et al., *Femtomolar sensitivity of a NO sensor from Clostridium botulinum*. Science, 2004. **306**(5701): p. 1550-3.
 85. Pellicena, P., et al., *Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(35): p. 12854-9.
 86. Ma, X., et al., *NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism*. EMBO J, 2007. **26**(2): p. 578-88.
 87. Ma, X., et al., *PAS-mediated dimerization of soluble guanylyl cyclase revealed by signal transduction histidine kinase domain crystal structure*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 1167-78.
 88. Ogawa, H., et al., *Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28625-31.
 89. Winger, J.A. and M.A. Marletta, *Expression and characterization of the catalytic domains of soluble guanylate cyclase: interaction with the heme domain*. Biochemistry, 2005. **44**(10): p. 4083-90.
 90. Shiga, T. and N. Suzuki, *Amphipathic alpha-helix mediates the heterodimerization of soluble guanylyl cyclase*. Zoolog Sci, 2005. **22**(7): p. 735-42.
 91. Rothkegel, C., et al., *Dimerization region of soluble guanylate cyclase characterized by bimolecular fluorescence complementation in vivo*. Mol Pharmacol, 2007. **72**(5): p. 1181-90.
 92. Zhou, Z., et al., *Structural and functional characterization of the dimerization region of soluble guanylyl cyclase*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 24935-43.
 93. Winger, J.A., et al., *The crystal structure of the catalytic domain of a eukaryotic guanylate cyclase*. BMC Struct Biol, 2008. **8**: p. 42.
 94. Warner, T.D., et al., *Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation*. Adv Pharmacol, 1994. **26**: p. 171-94.
 95. Sanders, K.M., et al., *Nitric oxide as a non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter in the gastrointestinal tract*. Jpn J Pharmacol, 1992. **58 Suppl 2**: p. 220P-225P.

-
96. Munzel, T., et al., *Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]*. *Circulation*, 2003. **108**(18): p. 2172-83.
 97. Pfeifer, A., et al., *Structure and function of cGMP-dependent protein kinases*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1999. **135**: p. 105-49.
 98. Hofmann, F. and G. Sold, *A protein kinase activity from rat cerebellum stimulated by guanosine-3':5'-monophosphate*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1972. **49**(4): p. 1100-7.
 99. de Jonge, H.R., *Cyclic GMP-dependent protein kinase in intestinal brushborders*. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1981. **14**: p. 315-33.
 100. Hofmann, F., A. Ammendola, and J. Schlossmann, *Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases*. *J Cell Sci*, 2000. **113** (Pt 10): p. 1671-6.
 101. Feil, R., et al., *Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice*. *Circ Res*, 2003. **93**(10): p. 907-16.
 102. Ruth, P., *Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting*. *Pharmacol Ther*, 1999. **82**(2-3): p. 355-72.
 103. Lohmann, S.M., et al., *Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases*. *Trends Biochem Sci*, 1997. **22**(8): p. 307-12.
 104. Schlossmann, J., R. Feil, and F. Hofmann, *Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice*. *Front Biosci*, 2005. **10**: p. 1279-89.
 105. Massberg, S., et al., *Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I*. *J Exp Med*, 1999. **189**(8): p. 1255-64.
 106. Alioua, A., et al., *The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(49): p. 32950-6.
 107. Fukao, M., et al., *Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(16): p. 10927-35.
 108. Ammendola, A., et al., *Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase Ibeta*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(26): p. 24153-9.
 109. Geiselhoring, A., et al., *IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase*. *EMBO J*, 2004. **23**(21): p. 4222-31.
 110. Schlossmann, J., et al., *Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta*. *Nature*, 2000. **404**(6774): p. 197-201.
 111. Goulding, E.H., G.R. Tibbs, and S.A. Siegelbaum, *Molecular mechanism of cyclic-nucleotide-gated channel activation*. *Nature*, 1994. **372**(6504): p. 369-74.

-
112. Yao, X., et al., *Primary structure and functional expression of a cGMP-gated potassium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11711-5.
 113. Broillet, M.C. and S. Firestein, *Cyclic nucleotide-gated channels. Molecular mechanisms of activation*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **868**: p. 730-40.
 114. Baylor, D., *How photons start vision*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 560-5.
 115. Wiesner, B., et al., *Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm*. J Cell Biol, 1998. **142**(2): p. 473-84.
 116. Craven, K.B. and W.N. Zagotta, *CNG and HCN channels: two peas, one pod*. Annu Rev Physiol, 2006. **68**: p. 375-401.
 117. Matulef, K. and W.N. Zagotta, *Cyclic nucleotide-gated ion channels*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 23-44.
 118. Omori, K. and J. Kotera, *Overview of PDEs and their regulation*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 309-27.
 119. Murrell, W., *Nitroglycerin as a remedy for angina pectoris*. Lancet, 1879. **1**: p. 80-81.
 120. Bode-Boger, S.M. and G. Kojda, *Organic nitrates in cardiovascular disease*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2005. **51**(3): p. 307-20.
 121. Bogaert, M.G., *Organic nitrates in angina pectoris*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1972. **196**: p. Suppl 196: 25-.
 122. Elkayam, U., et al., *The role of organic nitrates in the treatment of heart failure*. Prog Cardiovasc Dis, 1999. **41**(4): p. 255-64.
 123. Bennett, B.M., et al., *Biotransformation of organic nitrates and vascular smooth muscle cell function*. Trends Pharmacol Sci, 1994. **15**(7): p. 245-9.
 124. Chung, S.J. and H.L. Fung, *A common enzyme may be responsible for the conversion of organic nitrates to nitric oxide in vascular microsomes*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **185**(3): p. 932-7.
 125. Daiber, A., et al., *New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance*. Clin Res Cardiol, 2008. **97**(1): p. 12-20.
 126. Klemenska, E. and A. Beresewicz, *Bioactivation of organic nitrates and the mechanism of nitrate tolerance*. Cardiol J, 2009. **16**(1): p. 11-9.
 127. Munzel, T., et al., *Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance*. J Clin Invest, 1995. **95**(1): p. 187-94.
 128. Ko, F.N., et al., *YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase*. Blood, 1994. **84**(12): p. 4226-33.

-
129. Wu, C.C., et al., *YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase*. Br J Pharmacol, 1995. **116**(3): p. 1973-8.
 130. Honicka, M. and R. Gerzer, *[Soluble guanyl cyclases. Key enzymes for therapeutic applications of the NO principle]*. Internist (Berl), 1997. **38**(5): p. 427-37.
 131. Mulsch, A., et al., *Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(4): p. 681-9.
 132. Friebe, A., G. Schultz, and D. Koesling, *Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme*. EMBO J, 1996. **15**(24): p. 6863-8.
 133. Denninger, J.W., et al., *Interaction of soluble guanylate cyclase with YC-1: kinetic and resonance Raman studies*. Biochemistry, 2000. **39**(14): p. 4191-8.
 134. Stone, J.R. and M.A. Marletta, *The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane*. Biochemistry, 1995. **34**(50): p. 16397-403.
 135. Friebe, A. and D. Koesling, *Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(1): p. 123-7.
 136. Friebe, A., et al., *A point-mutated guanylyl cyclase with features of the YC-1-stimulated enzyme: implications for the YC-1 binding site?* Biochemistry, 1999. **38**(46): p. 15253-7.
 137. Friebe, A., et al., *Functions of conserved cysteines of soluble guanylyl cyclase*. Biochemistry, 1997. **36**(6): p. 1194-8.
 138. Lamothe, M., et al., *Functional characterization of nitric oxide and YC-1 activation of soluble guanylyl cyclase: structural implication for the YC-1 binding site?* Biochemistry, 2004. **43**(11): p. 3039-48.
 139. Stasch, J.P., et al., *NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase*. Nature, 2001. **410**(6825): p. 212-5.
 140. Stasch, J.P., et al., *NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle*. Br J Pharmacol, 2002. **136**(5): p. 773-83.
 141. Stasch, J.P., et al., *Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels*. J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2552-61.
 142. Straub, A., et al., *NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase*. Bioorg Med Chem Lett, 2001. **11**(6): p. 781-4.
 143. Mittendorf, J., et al., *Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension*. ChemMedChem, 2009. **4**(5): p. 853-65.
 144. Schindler, U., et al., *Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(4): p. 1260-8.

-
145. Schmidt, H.H., P.M. Schmidt, and J.P. Stasch, *NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators*. Handb Exp Pharmacol, 2009(191): p. 309-39.
 146. Schmidt, P., et al., *Preparation of heme-free soluble guanylate cyclase*. Protein Expr Purif, 2003. **31**(1): p. 42-6.
 147. Evgenov, O.V., et al., *NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 755-68.
 148. Hoffmann, L.S., et al., *Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(5): p. 781-95.
 149. Bamberger, A.M., et al., *Expression and tissue localization of soluble guanylyl cyclase in the human placenta using novel antibodies directed against the alpha(2) subunit*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(2): p. 909-12.
 150. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 151. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
 152. Sambrook, R., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (3rd ed.) ed. 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 153. Budäus, L.H., *Untersuchung von Untereinheiten der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylyl-Cyclase nach Kopplung mit dem grün-fluoreszierenden Protein*, in *Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie*. 2002, Universität Hamburg: Dissertation.
 154. Koglin, M. and S. Behrends, *Cloning and functional expression of the rat alpha(2) subunit of soluble guanylyl cyclase*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1494**(3): p. 286-9.
 155. Pedelacq, J.D., et al., *Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(1): p. 79-88.
 156. Ai, H.W., et al., *Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins*. Biochemistry, 2007. **46**(20): p. 5904-10.
 157. Reed, L. and H. Muench, *A simple method for estimating fifty percent endpoint*. Am J Hyg, 1938(27): p. 493-497.
 158. Dougherty, R.M., *Animal virus titration techniques*. Techniques in Experimental Virology. 1964, New York: Academic Press. 169-223.
 159. Hughes, P.R. and H.A. Wood, *In vivo and in vitro bioassay methods of baculoviruses*. The Biology of Baculovirus. Vol. 2. 1986, Boca Raton: CRC Press. 1-30.
 160. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

-
161. Schultz, G., and Böhme, E, *In: Methods of Enzymatic Analysis*. In: Methods of Enzymatic Analysis 3rd Ed., Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1984. **Vol. 4**, pp.,: p. 379-389.
162. Chan, P.S., C.T. Black, and B.J. Williams, *Separation of cyclic 3',5'-AMP from ATP, ADP, and 5'-AMP by precipitation with inorganic compounds*. Anal Biochem, 1973. **55**(1): p. 16-25.
163. Schmidt, T.G., et al., *Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin*. J Mol Biol, 1996. **255**(5): p. 753-66.
164. Schmidt, T.G. and A. Skerra, *One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin*. J Chromatogr A, 1994. **676**(2): p. 337-45.
165. Schmidt, T.G. and A. Skerra, *The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins*. Nat Protoc, 2007. **2**(6): p. 1528-35.
166. Voss, S. and A. Skerra, *Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification*. Protein Eng, 1997. **10**(8): p. 975-82.
167. Lamla, T., K. Mammeri, and V.A. Erdmann, *The cell-free protein biosynthesis--applications and analysis of the system*. Acta Biochim Pol, 2001. **48**(2): p. 453-65.
168. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Ann. Physik, 1948. **6**(2): p. 55-75.
169. Stryer, L. and R.P. Haugland, *Energy transfer: a spectroscopic ruler*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **58**(2): p. 719-26.
170. Dale, R.E., J. Eisinger, and W.E. Blumberg, *The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer*. Biophys J, 1979. **26**(2): p. 161-93.
171. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 1983, New York: Plenum Press. xiv, 496 p.
172. Stryer, L., *Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler*. Annu Rev Biochem, 1978. **47**: p. 819-46.
173. Clegg, R.M., *Fluorescence resonance energy transfer*. Curr Opin Biotechnol, 1995. **6**(1): p. 103-10.
174. Clegg, R.M., *FRET tells us about proximities, distances, orientations and dynamic properties*. J Biotechnol, 2002. **82**(3): p. 177-9.
175. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 1962. **59**: p. 223-39.
176. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 509-44.
177. Gordon, G.W., et al., *Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy*. Biophys J, 1998. **74**(5): p. 2702-13.

-
178. Youvan, D.C., C. M. Silva, E. J. Bylina, W. J. Coleman, M. R. Dilworth, and a.M.M. Yang., *Calibration of fluorescence resonance energy transfer in microscopy using genetically engineered GFP derivatives on nickel chelating beads*. Biotechnology et alia., 1997. **3**: p. 1–18.
 179. Elangovan, M., et al., *Characterization of one- and two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer microscopy*. Methods, 2003. **29**(1): p. 58-73.
 180. Hoebe, R.A., et al., *Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(2): p. 249-53.
 181. Nikolaev, V.O., S. Gambaryan, and M.J. Lohse, *Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP*. Nat Methods, 2006. **3**(1): p. 23-5.
 182. Kolossov, V.L., et al., *Engineering redox-sensitive linkers for genetically encoded FRET-based biosensors*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(2): p. 238-48.
 183. Hung, A.Y. and M. Sheng, *PDZ domains: structural modules for protein complex assembly*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 5699-702.
 184. Ma, X., A. Beuve, and F. van den Akker, *Crystal structure of the signaling helix coiled-coil domain of the beta1 subunit of the soluble guanylyl cyclase*. BMC Struct Biol, 2010. **10**: p. 2.
 185. Truong, K. and M. Ikura, *The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(5): p. 573-8.
 186. Ormo, M., et al., *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1392-5.
 187. Iyer, L.M., V. Anantharaman, and L. Aravind, *Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins*. BMC Genomics, 2003. **4**(1): p. 5.
 188. Lee, Y.C., E. Martin, and F. Murad, *Human recombinant soluble guanylyl cyclase: expression, purification, and regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 10763-8.
 189. Zabel, U., et al., *Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18149-52.
 190. Schulz, S., et al., *Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor*. Cell, 1990. **63**(5): p. 941-8.
 191. Lowe, D.G., et al., *Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5535-9.
 192. Fulle, H.J., et al., *A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3571-5.
 193. Misono, K.S., *Natriuretic peptide receptor: structure and signaling*. Mol Cell Biochem, 2002. **230**(1-2): p. 49-60.

-
194. Alverdi, V., et al., *cGMP-binding prepares PKG for substrate binding by disclosing the C-terminal domain*. J Mol Biol, 2008. **375**(5): p. 1380-93.
195. Tesmer, J.J., et al., *Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S*. Science, 1997. **278**(5345): p. 1907-16.
196. Becker, E.M., et al., *NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272*. BMC Pharmacol, 2001. **1**: p. 13.
197. Haase, N., et al., *Nitric oxide sensitive guanylyl cyclase activity decreases during cerebral postnatal development because of a reduction in heterodimerization*. J Neurochem, 2010. **112**(2): p. 542-51.
198. Pifarre, P., et al., *NO-sensitive guanylyl cyclase beta1 subunit is peripherally associated to chromosomes during mitosis. Novel role in chromatin condensation and cell cycle progression*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(8-9): p. 1719-30.
199. Agullo, L., et al., *Membrane association of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 2005. **68**(1): p. 65-74.
200. Zabel, U., et al., *Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(4): p. 307-11.
201. Hoffmüller, U., et al., *Interaction of a PDZ Protein Domain with a Synthetic Library of All Human Protein C Termini*. Angewandte Chemie International Edition, 1999. **38**(13-14): p. 2000-2004.
202. Brenman, J.E. and D.S. Bredt, *Synaptic signaling by nitric oxide*. Curr Opin Neurobiol, 1997. **7**(3): p. 374-8.
203. Garthwaite, J. and C.L. Boulton, *Nitric oxide signaling in the central nervous system*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 683-706.
204. Bellingham, M. and T.J. Evans, *The alpha2beta1 isoform of guanylyl cyclase mediates plasma membrane localized nitric oxide signalling*. Cell Signal, 2007. **19**(10): p. 2183-93.
205. Baillie, G.S., *Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases*. FEBS J, 2009. **276**(7): p. 1790-9.
206. Garner, C.C., J. Nash, and R.L. Huganir, *PDZ domains in synapse assembly and signalling*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(7): p. 274-80.
207. Javier, R.T., *Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses*. Oncogene, 2008. **27**(55): p. 7031-46.
208. Bauer, H., et al., *The dual role of zonula occludens (ZO) proteins*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 402593.
209. Kleppisch, T., *Phosphodiesterases in the central nervous system*. Handb Exp Pharmacol, 2009(191): p. 71-92.

-
210. Kleppisch, T. and R. Feil, *cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour*. Handb Exp Pharmacol, 2009(191): p. 549-79.
211. Bidmon, H.J., et al., *Cerebral expression of the alpha2-subunit of soluble guanylyl cyclase is linked to cerebral maturation and sensory pathway refinement during postnatal development*. Neurochem Int, 2004. **45**(6): p. 821-32.
212. Bidmon, H.J., et al., *Cerebellar localization of the NO-receptive soluble guanylyl cyclase subunits-alpha(2)/beta (1) in non-human primates*. Cell Tissue Res, 2006. **326**(3): p. 707-14.
213. Monfort, P. and V. Felipo, *Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase and cGMP-degrading phosphodiesterase, alterations in hyperammonemia*. BMC Pharmacol, 2005. **5 Suppl 1**: p. P66.
214. Monfort, P., et al., *Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase*. J Neurosci, 2002. **22**(23): p. 10116-22.
215. Monfort, P., et al., *Sequential activation of soluble guanylate cyclase, protein kinase G and cGMP-degrading phosphodiesterase is necessary for proper induction of long-term potentiation in CA1 of hippocampus. Alterations in hyperammonemia*. Neurochem Int, 2004. **45**(6): p. 895-901.
216. Haghikia, A., et al., *Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases*. J Neurosci, 2007. **27**(4): p. 818-23.
217. Taqatqeh, F., et al., *More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation*. J Neurosci, 2009. **29**(29): p. 9344-50.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der NO/cGMP Signalweg.....	17
Abbildung 2: Aufbau der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase Untereinheiten	19
Abbildung 3: Hämabhängige und hämunabhängige Modulatoren der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase.....	24
Abbildung 4: Normalisierte Anregungs- und Emissionsspektren von fluoreszierenden Proteinen und fluoreszenzmarkierten Guanylyl-Cyclase Untereinheiten	57
Abbildung 5: Koexpression und Vermischung von CFP und YFP führt zu keiner messbaren FRET-Effizienz.....	58
Abbildung 6: Der cGMP Sensor YFP-GAFA-CFP zeigt eine cGMP abhängige FRET-Änderung in cytosolischer Fraktion von Sf9-Zellen	60
Abbildung 7: Expression nativer und fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Untereinheiten im Sf9/Baculovirus System	62
Abbildung 8: Messung der spezifischen Enzymaktivität nativer- und fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Varianten.....	63
Abbildung 9: Expression und Anreinigung von Enzymvarianten mit einer aminoterminal markierten β_1 -Untereinheit	64
Abbildung 10: Spektrale Analyse der angereinigten α_1 Strep/YFP β_1 Enzymvariante.....	65
Abbildung 11: Messung der spezifischen Guanylyl-Cyclase-Aktivität angereinigter α_1 Strep/YFP β_1 Enzymvariante.....	66
Abbildung 12: FRET-Effizienzen fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Varianten.....	68
Abbildung 13: Expression fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine	70
Abbildung 14: Messung der spezifischen Enzymaktivität fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine.....	71
Abbildung 15: Expression und Anreinigung des β_1 YFP α_2 Strep Fusionsproteins	72
Abbildung 16: Messung der Enzymaktivität des angereinigten β_1 YFP α_2 Strep Fusionsproteins	73
Abbildung 17: Spektrale Eigenschaften der fluoreszierenden Proteine der fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine.....	74
Abbildung 18: FRET-Effizienzen der fluoreszenzmarkierten Fusionproteine im Vergleich zu den fluoreszenzmarkierten heterodimeren Enzymvarianten (Abbildung 13).....	75
Abbildung 19: FRET-Effizienzen fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Untereinheiten.....	77
Abbildung 20: Expression der α_1 Isoform fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine in HEK 293-Zellen	78
Abbildung 21: Expression der α_2 Isoform fluoreszenzmarkierter Guanylyl-Cyclase Fusionsproteine in transient transfizierten HEK 293-Zellen	80
Abbildung 22: Koexpression von β_1 YFP α_1 und β_1 Azurite α_2 in HEK 293-Zellen.....	81
Abbildung 23: Spezifische Lokalisation des β_1 YFP α_2 Fusionsproteins an Zell-Zell Kontakten	83
Abbildung 24: <i>In vivo</i> Lokalisation verschiedener Mutanten des β_1 YFP α_2 Fusionsproteins	84
Abbildung 25: Expression des β_1 YFP α_2 Fusionsproteins und der mutierten Varianten in HEK 293-Zellen	85

Abbildung 26: Expression von fluoreszenzmarkierten SAP90 und DLG in transient transfizierten HEK 293-Zellen	86
Abbildung 27: Membranäre Lokalisation von fluoreszenzmarkiertem <i>scribble</i> in HEK 293-Zellen.....	87
Abbildung 28: Koexpression von β_1 YFP α_2 und scribble CFP in HEK 293-Zellen	88
Abbildung 29: Modelle der Domänenorganisation des heterodimeren Guanylyl-Cyclase Enzymkomplexes	90
Abbildung 30: Postulierte Aktivierungsmechanismen der membranständigen Guanylyl-Cyclase und der Proteinkinase G (aus [88, 194])	95
Abbildung 31: Mögliche Protein-Protein Interaktion zwischen den regulatorischen Domänen und der katalytischen Domäne der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (nach [87, 93, 195])	97

9. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäuren
BAY 41-2272	5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine
BAY 41-8543	(2-[1-[(2-fluorophenyl)methyl]-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-5-(4-morpholinyl)-4,6-pyrimidinediamine)
BAY 58-2667	Cinaciguat; 4-({(4-carboxybutyl)[2-(2-{[4-(2-phenylethyl)phenyl]-methoxyphenyl}=ethyl]amino)methyl)benzoic acid
BAY 63-2521	(Methyl- <i>N</i> -[4,6-Diamino-2-[1-[(2-fluorophenyl)methyl]-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-5-pyrimidinyl]- <i>N</i> -methyl-carbaminat)
BFP	Blue Fluorescent Protein
Bluo-gal	5-Bromo-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
Bq	Bequerell
bp	DNA-Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	Transskript einer DNA Sequenz
CFP	cyan fluoreszierendes Protein (<i>cyan fluorescent protein</i>)
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
Ci	Curie
CO	Kohlenmonoxid
cpm	Zählereignisse pro Minute
Da	Dalton
DEA/NO	1,1-Diethyl-2-hydroxy-2-nitroso-hydrazin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EC ₅₀	halbmaximale Effektorkonzentration
EDRF	endothelialer relaxierender Faktor (endothelium derived relaxing factor)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
HMR1766	Atacigat; 5-Chloro-2-[[[(5-chloro-2-thienyl)sulfonyl]amino]-N-[4-(4-morpholinylsulfonyl)phenyl] benzamide
HRP	Meerrettichperoxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
LB	Luria Bertoni
L-NMMA	L-NG-Monomethyl Arginine
MOI	Infektionshäufigkeit (<i>multiplicity of infection</i>)
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OD	optische Dichte
³² P	Phosphorisotop 32
PAS	funktionelle Proteindomäne (Per/Arnt/Sim) benannt nach den Proteinen: Per (<i>period clock protein</i>), Arnt (<i>aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>), Sim (<i>single minded</i>)
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase
PDZ	Proteininteraktionsdomäne benannt nach den Proteinen: PSD 95/SAP 90 (<i>post synaptic density protein</i>), DLG (<i>disc large</i>), ZO (<i>zona occludens</i>)
PPIX	Protoporphyrin IX
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)

S.E.M.	mittlerer Fehler des Mittelwertes (<i>standard error of means</i>)
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SOC	Salz-optimiertes Medium mit Glukose (Salt-Optimized+Carbon)
sGC	lösliche Guanylyl-Cyclase; NO-sensitive Guanylyl-Cyclase
TAE	Tris-Acetat gepufferte Lösung mit EDTA
TBST	Tris-gepufferte Salz-Tween-Lösung (<i>Tris-buffered-saline-tween</i>)
TCID ₅₀	Viruskonzentration, die 50 % der Zellkultur infiziert
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit (Enzymeinheit)
YC-1	3-[5'-Hydroxymethyl-2'-furyl]-1-benzylindazol
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Soenke Behrends, für die ausgezeichnete Betreuung und für die wissenschaftliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Insbesondere danke ich Ihm für die Freiheit, die er mir bei der Gestaltung der Forschungsprojekte gewährte.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Prof. Ludger Beerhues und Prof. Uwe Panten dankbar.

Für die exzellente, technische Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und für die große Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei Ines Thomsen, Anja Stieler, Gerlind Henze-Wittenberg und Jana Zenk herzlich bedanken.

Ich danke meinen Kollegen Uli Beyer, Mareike Busker, Katrin Hatlapatka, Jan Krähling, Steffi Oberle, Monika Seeanner, Michael Willenborg für die hervorragende Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und eine sehr schöne Zeit in Braunschweig.

Schließlich bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie für Ihre Unterstützung und finanzielle Hilfe und bei meinen Freunden für anregende, naturwissenschaftlich-philosophische Unterhaltungen, speziell bei den Familien Krause/Broer, Krause, Seidler, van der Heyden/Müller sowie bei Thomas, Carsten, Scoob, Tommy, Axel, Herbi, Bernoulli, Jeanette, Claudia und Anja.

Besonderer Dank geht an meine Frau, die mich bei all meinen Vorhaben unterstützt und ermutigt hat.